

Rec'd PCT/PTO 23 JUN 2005

BEST AVAILABLE COPY

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年4月8日 (08.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/029018 A1(51) 国際特許分類: C07C 233/47, 323/52, C07D
207/404, C07K 14/53, C12N 9/00, A61K 38/00, 38/27,
38/28, 38/43, 38/48, 39/395, 47/48, A61P 43/00工業株式会社 本社内 Tokyo (JP). 山口 弘之 (YAM-
AGUCHI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都 千代
田区 大手町一丁目 6 番 1 号 協和醸酵工業株式会社
本社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011214

(22) 国際出願日: 2003年9月2日 (02.09.2003)

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI, Shohel et al.); 〒107-
6028 東京都 港区 赤坂一丁目 1 2 番 3 2 号 アーク森
ビル 2 8 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

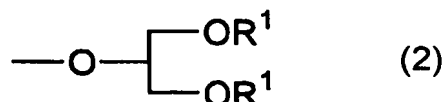
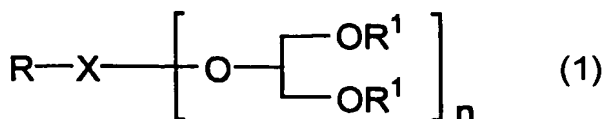
(30) 優先権データ:
特願2002-281364 2002年9月26日 (26.09.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和
醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都 千代田区 大手町一
丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP). 株式会社テクノネットワ
ーク四国 (TECNO NETWORK SHIKOKU CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒760-0033 香川県 高松市 丸の内 2 番 5 号
Kagawa (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 根本 尚夫
(NEMOTO, Hisao) [JP/JP]; 〒770-8505 徳島県 徳
島市 庄町 1-7 8 徳島大学大学院薬学研究科
内 Tokushima (JP). 山崎 基生 (YAMASAKI, Motoo)
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都 千代田区 大手町一丁目
6 番 1 号 協和醸酵工業株式会社 本社内 Tokyo (JP).
須澤 敏行 (SUZAWA, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒100-8185
東京都 千代田区 大手町一丁目 6 番 1 号 協和醸酵添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GLYCEROL DERIVATIVE

(54) 発明の名称: グリセロール誘導体

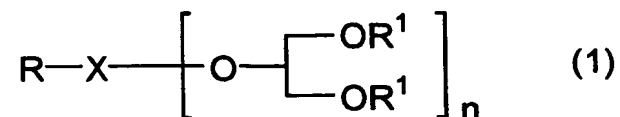
(57) Abstract: A compound represented by the follow-
ing formula (1): (1) wherein R represents a residue hav-
ing either a reactive group or a group capable of chang-
ing into a reactive group; n is an integer of 3 or larger;
X represents a residue capable of having n groups of the
formula (2) and the six or more R¹'s are the same or dif-
ferent and each represents hydrogen or a group capable of
changing into hydrogen. The compound can chemically
modify physiologically active polypeptides, derivatives
thereof, or low-molecular compounds, while maintain-
ing the physiological activity thereof. The compound is
useful for improving the stability or water solubility of
low-molecular compounds.

[続葉有]

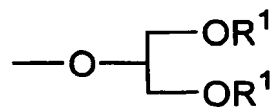
WO 2004/029018 A1



(57) 要約:



(式中、R は反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基を表し、n は 3 以上の整数を表し、X は n 個の



を有することが可能な残基を表し、R¹ は水素原子または水素原子に変換可能な基を表し、6 個以上存在する R¹ はそれぞれ同一でも異なってもよい)

生理活性を維持した状態で生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物を化学修飾し得る、または低分子化合物の安定性もしくは水溶性の向上に有用である上記式 (1) で表される化合物を提供する。

明 細 書

グリセロール誘導体

技術分野

本発明は、生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物の化学修飾に有用な化合物に関する。また、本発明は、生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物が少なくとも 1 個の該化合物で修飾された化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物、および該化学修飾ポリペプチドまたは該化学修飾低分子化合物を含有する医薬に関する。さらに、本発明は、該化合物で生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物を化学修飾することを特徴とする、該生理活性ポリペプチドもしくは該その誘導体または該低分子化合物の安定性または水溶性を向上させる方法に関する。

背景技術

生理活性を有するポリペプチドは特定の疾病に対する治療剤として有用であるが、血中に投与されると安定性が悪く、十分な薬理効果が期待できない場合が多い。例えば、血中に存在する加水分解酵素等によって分解され、生理活性を失うことがある。さらに、外因性の生理活性ポリペプチドにおいてもその生理活性が疾患の治療に有効なことがあるが、そのような外因性のポリペプチドや遺伝子組換えによって製造されたポリペプチド等は内因性のポリペプチドと構造が異なるために、それらが血中に投与された場合には免疫反応を誘発し、アナフィラキシーショック等の重篤な副作用を起こす場合もあることが知られている。さらに、生理活性ポリペプチドの中にはそれが治療剤として用いられる際に、溶解性が悪い等の物性が問題になるものも多い。

生理活性ポリペプチドを治療剤として用いる際のこれらの問題を解決する方法の一つとして、ポリエチレングリコール等の不活性型ポリマー鎖をポリペプチドに化学的に結合させる方法が第一に知られている。

例えば、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) のポリエチレングリコール修飾が知られている [「ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)」, 1994 年, 第 115 巻, p. 814-819]。その他にもアスパラギナー

ゼ、グルタミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウリカーゼ等のポリエチレングリコール修飾の例が報告されている [ティム・ジェイ・ハーン (Tim J. Ahern)、マーク・シー・マンニング (Mark C. Manning) 著, 「ファーマシューティカル・バイオテクノロジー第 3 巻, スタビリティ・オブ・プロテイン・ファーマシューティカルズ・パート B, イン・ビボ・パスウェイズ・オブ・デグラデーション・アンド・ストラテジーズ・フォー・プロテイン・スタビライゼーション (Pharmaceutical Biotechnology Volume 3, Stability of Protein Pharmaceuticals, Part B, In Vivo Pathways of Degradation and Strategies for Protein Stabilization)」, (米国), プレナム・パブリッシング (Plenum Publishing Co.), 1992 年 11 月, p. 235-263]。生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコールで修飾することによって得られる効果としては、血中持続性が向上する、抗原性・免疫原性が低下する、血中安定性が向上する等の他に、熱安定性が高まること [生物物理, 1998 年, 第 38 巻, p. 208]、有機溶媒に可溶となること [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications), 1984 年, 第 122 巻, p. 845] 等も知られている。

しかしながら、生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコールで修飾する際には、該ポリペプチドの生理活性を損なわずに血中安定性を向上させることは困難な場合が多い。一般的に、ポリアルキレングリコールの分子量が大きいほど、または修飾率が高いほど該ポリペプチドの血中持続性は向上することが知られているが [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 1988 年, 第 263 巻, p. 15064]、修飾率を高くすると該ポリペプチドの生理活性が損なわれることがある。これは、生理活性に必要な特定のアミノ基やメルカプト基等のアミノ酸残基が化学修飾剤によって修飾されること、生理活性ポリペプチドに結合したポリアルキレングリコールが生理活性部位の相互作用を妨害すること等が原因と考えられている。修飾率に応じて生理活性が低下する例としては、インターロイキン-15 が知られている [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 1997 年, 第 272 巻, p. 2312]。このように、化学修飾によって数多くのメリットが得られるが、一般的に化学修飾によってポリ

ペプチドの生理活性が損なわれてしまうことから、修飾を行ってもポリペプチドの生理活性が損なわれない化学修飾剤が所望されている。

一方、多くの低分子化合物は水溶性が低く、生理活性を発揮するレベルの濃度の水溶液を調製することが困難な場合がある。また、一旦水溶液を調製できたとしても、保存中に沈殿を形成し、溶液濃度の実質的な低下を来す場合もある。例えば、多くの抗癌剤や抗生物質、抗ウイルス剤等の化合物がこれに該当する。このため、生理化学的な実験を行ったり、治療用の薬剤を生体に投与したりする場合、目的とする有効濃度が得られないばかりでなく、目的の薬理効果を達成できない可能性がある。そこで、ポリマーや界面活性物質を混合または化学的に結合させて難水溶性低分子化合物を可溶化させて利用する試みが行われている。例えば、ポリエチレンオキサイドとアスパラギン酸の共重合体をアンホテリシン B (Amphotericin B) の可溶化に利用した例が知られている [ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース (Journal of Controlled Release), 1998 年, 第 53 巻, p. 131-136]。また、シクロデキストリンをアンホテリシン B の可溶化に利用した例も知られている [バイオポリマーズ (Biopolymers), 1989 年, 第 28 巻, p. 1585-1596]。また、コレステロール等の低分子化合物の可溶化のために、胆汁酸ミセル等も利用されている。抗癌剤の溶解性を向上させるためにポリエチレングリコール等も利用されている [「キャンサー・リサーチ (Cancer Research)」, 1990 年, 第 50 巻, p. 1693-1700]。以上のように、生理活性を損なわずに低分子化合物を可溶化するための手法および試薬が求められている。この際、上記のように可溶化剤を添加する方法では、再現性の問題や可溶化剤自身の影響を考慮する必要がある。そこで、低分子化合物自身を化学修飾し、溶解性や安定性を向上できる試薬および方法が望まれている。

一方、グリセロールを構造中に有するデンドリマーが知られている [「マクロモレキュールズ (Macromolecules)」, 2001 年, 第 34 巻, p. 7648-7655; 「ポリマー・プリプリント (Polymer Preprints)」, 2001 年, 第 42 巻, p. 155-156; 「ポリマー・プリプリント (Polymer Preprints)」, 2001 年, 第 42 巻, p. 157-158; 「ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (Journal of American Chemical Society)」, 2001 年, 第 123 巻, p. 2905-2906; 「ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (Journal of American Chemical

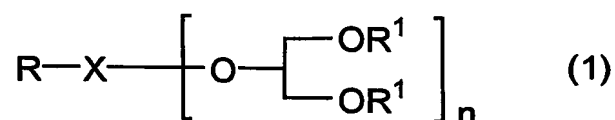
Society)」, 2000 年, 第 122 巻, p.10335-10344; 「チャイニーズ・ジャーナル・オブ・ケミストリー (Chinese Journal of Chemistry)」, 1998 年, 第 16 巻, p.28-33]。

発明の開示

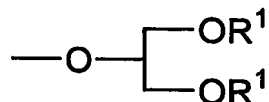
従来の化学修飾剤を用いて調製された化学修飾生理活性ポリペプチドでは生理活性が著しく低下する場合があります、生理活性が損なわれない化学修飾法が望まれている。また、多くの難水溶性低分子化合物の水溶性を向上させる方法が望まれている。

本発明は、以下の (1) ~ (30) に関する。

(1) 式 (1)



(式中、R は反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基を表し、n は 3 以上の整数を表し、X は n 個の



を有することが可能な残基を表し、R¹ は水素原子または水素原子に変換可能な基を表し、6 個以上存在する R¹ はそれぞれ同一でも異なってもよい) で表される化合物。

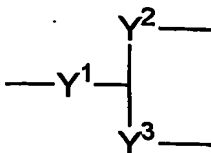
(2) 全ての R¹ が水素原子である、前記 (1) 記載の化合物。

(3) 全ての R¹ がベンジルである、前記 (1) 記載の化合物。

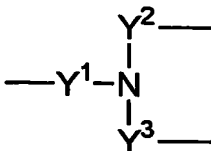
(4) n が 2^m (式中、m は 2 以上の整数を表す) である、前記 (1) ~ (3) のいずれか 1 項に記載の化合物。

(5) X が 1 以上の直列的分岐構造を有する、前記 (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の化合物。

(6) X が 1 個以上 (n-1) 個以下の

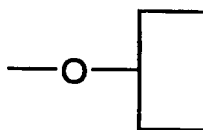


または



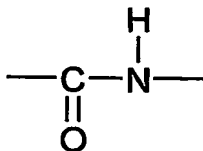
(式中、 Y^1 、 Y^2 および Y^3 はそれぞれ独立して、単結合、あるいは置換もしくは非置換のアルキレン、カルボニル、置換もしくは非置換のイミノ、O、S、スルホニルおよびスルフィニルからなる群より選ばれる一つまたは同一もしくは異なった複数の任意の組み合わせを表し、 Y^1 、 Y^2 および Y^3 が複数存在するとき、これらはそれぞれ同一でも異なっているいてもよい) で表される構造を含有する、前記 (1) ~ (5) のいずれか 1 項に記載の化合物。

(7) X が 1 個以上 (n-1) 個以下の



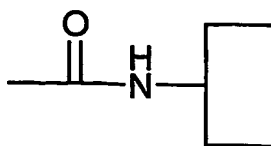
で表される構造を含有する、前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の化合物。

(8) X が 1 個以上 (n-1) 個以下の



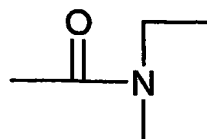
で表される構造を含有する、前記 (1) ~ (7) のいずれか 1 項に記載の化合物。

(9) X が 1 個以上 (n-1) 個以下の



で表される構造を含有する、前記 (1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の化合物。

(10) X が 1 個以上 (n-1) 個以下の



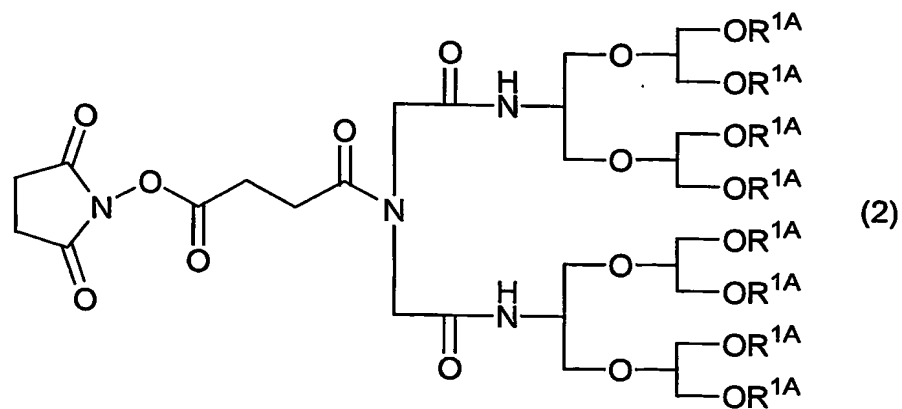
で表される構造を含有する、前記 (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の化合物。

(11) 反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基が、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体中のアミノ酸側鎖、N 末端アミノ基もしくは C 末端カルボキシル基、あるいはポリペプチドと結合した糖鎖との反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基である前記 (1) ~ (10) のいずれか 1 項に記載の化合物。

(12) 反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基が、カルボン酸活性エステル残基、カーボネート、マレイミド、メルカプト、ホルミル、トレシル、イソシアナート、酸無水物残基、酸ハロゲン化物残基、ビニルスルホニル、ヒドラジド、アミノ、水酸基、ハロゲン、カルボキシ、ビニルおよびホスホノからなる群より選ばれる基である前記 (1) ~ (11) のいずれかに記載の化合物。

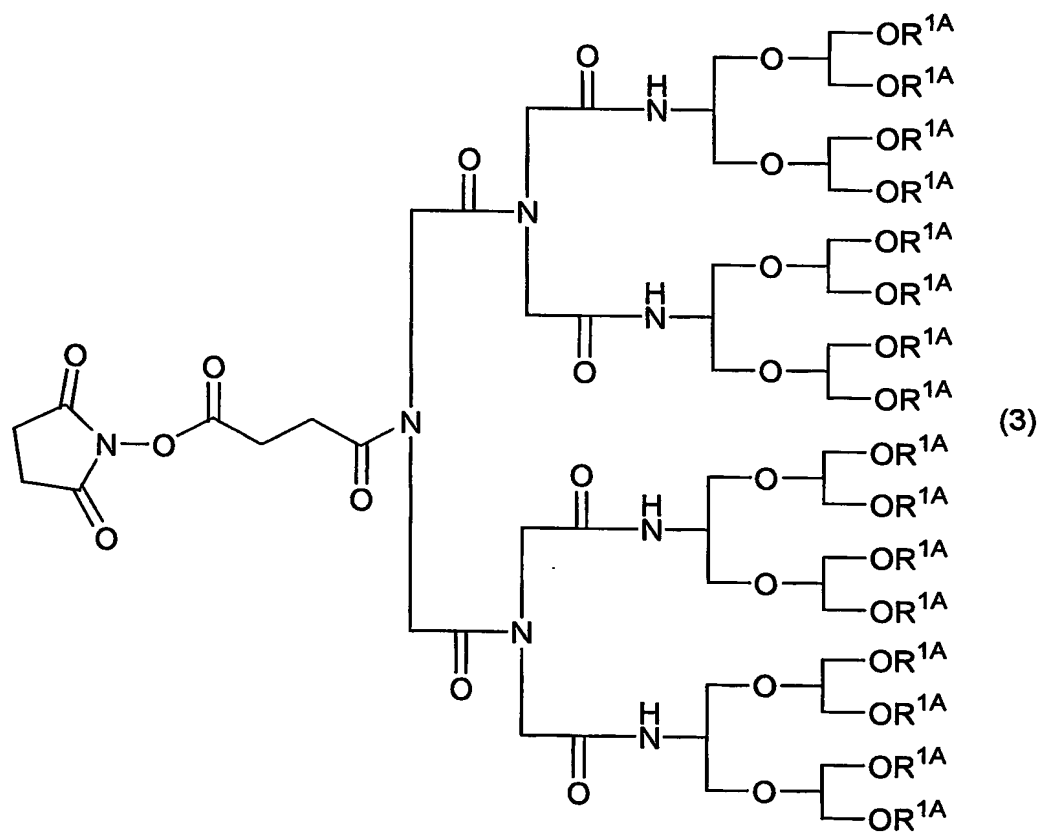
(13) 前記 (1) ~ (12) のいずれか 1 項に記載の化合物を少なくとも二つ含有する混合物。

(14) 式 (2)



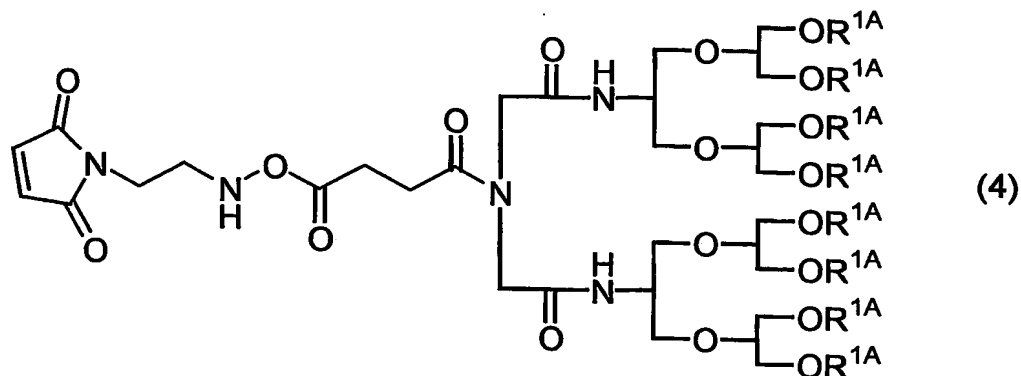
(式中、 R^{1A} は水素原子またはベンジルを表す) で表される化合物。

(15) 式 (3)



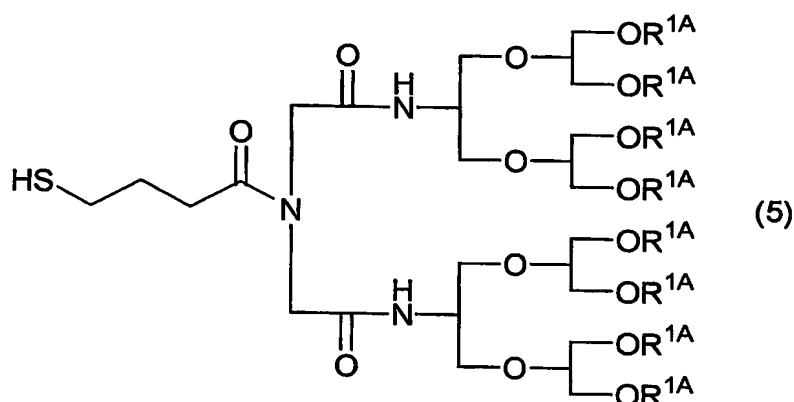
(式中、 R^{1A} は水素原子またはベンジルを表す) で表される化合物。

(16) 式 (4)



(式中、R^{1A}は水素原子またはベンジルを表す) で表される化合物。

(17) 式 (5)



(式中、R^{1A}は水素原子またはベンジルを表す) で表される化合物。

(18) 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が少なくとも 1 個の前記 (1) ~ (12) および (14) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の化合物で直接もしくはスパーサーを介して修飾された化学修飾ポリペプチド。

(19) 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、酵素、サイトカイン、ホルモン、毒素、抗体およびそれらの誘導体からなる群より選ばれる前記 (18) 記載の化学修飾ポリペプチド。

(20) 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、アスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide Disumutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine

Deaminase)、インターロイキン-1~24 (Interleukin-1~24)、インターフェロン- α (Interferon- α)、インターフェロン- β (Interferon- β)、インターフェロン- γ (Interferon- γ)、インターフェロン- ω (Interferon- ω)、インターフェロン- τ (Interferon- τ)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、エリスロポエチン (Erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、クローソ (Klotho) 蛋白質、レプチン (Leptin)、繊維芽細胞増殖因子 1~19 (Fibroblast Growth Factor-1~19)、ミッドカイン (Midkine)、カルシトニン (Calcitonin)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、グルカゴン (Glucagon)、インスリン (Insulin)、インスリン様成長因子 1 (Insulin-like Growth Factor-1)、オステオジェニックプロテイン 1 (Osteogenic Protein-1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Growth Factor)、アミリン (Amylin)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon-like Peptide)、成長ホルモン (Growth Hormone)、ナトリウム利尿ペプチド類 (Natriuretic Peptide)、プラスミノゲン (Plasminogen)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、エンドスタチン (Endostatin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Cell Growth Factor)、リシン (Ricin)、シュードモナス外毒素 (Pseudomonas Exotoxin)、ジフテリア毒素 (Diphtheria Toxin) およびそれらの溶解性レセプターならびにそれらの誘導体からなる群より選ばれる前記 (18) 記載の化学修飾ポリペプチド。

(21) 生理活性ポリペプチドの誘導体が、該ポリペプチドのアミノ酸欠失体、アミノ酸置換体、アミノ酸挿入体、アミノ酸付加体、糖鎖欠失体および糖鎖付加体からなる群より選ばれる前記 (18) ~ (20) のいずれか 1 項に記載の化学修飾ポリペプチド。

(22) 前記 (18) ~ (21) のいずれか 1 項に記載の化学修飾ポリペプチドを含む有する医薬。

(23) 前記 (1) ~ (12) および (14) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の化合物で生理活性ポリペプチドまたはその誘導体を化学修飾することを特徴とする、該生理活性ポリペプチドまたは該その誘導体の安定性または水溶性を向上させる方法。

(24) 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、酵素、サイトカイン、ホルモン、毒素、抗体およびそれらの誘導体からなる群より選ばれる前記 (23) 記載の方法。

(25) 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、アスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide Disumutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine Deaminase)、インターロイキン-1~24 (Interleukin-1~24)、インターフェロン- α (Interferon- α)、インターフェロン- β (Interferon- β)、インターフェロン- γ (Interferon- γ)、インターフェロン- ω (Interferon- ω)、インターフェロン- τ (Interferon- τ)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、エリスロポエチン (Erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、クローソ (Klotho) 蛋白質、レプチン (Leptin)、繊維芽細胞増殖因子 1~19 (Fibroblast Growth Factor-1~19)、ミッドカイン (Midkine)、カルシトニン (Calcitonin)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、グルカゴン (Glucagon)、インスリン (Insulin)、インスリン様成長因子 1 (Insulin-like Growth Factor-1)、オステオジェニックプロテイン 1 (Osteogenic Protein-1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Growth Factor)、アミリン (Amylin)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon-like Peptide)、成長ホルモン (Growth Hormone)、ナトリウム利尿ペプチド類 (Natriuretic Peptide)、プラスミノゲン (Plasminogen)、アンジオポエチン

(Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、エンドスタチン (Endostatin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor)、リシン (Ricin)、シュードモナス外毒素 (Pseudomonas Exotoxin)、ジフテリア毒素 (Diphtheria Toxin) およびそれらの溶解性レセプターならびにそれらの誘導体からなる群より選ばれる前記 (23) 記載の方法。

(26) 生理活性ポリペプチドの誘導体が、該ポリペプチドのアミノ酸欠失体、アミノ酸置換体、アミノ酸挿入体、アミノ酸付加体、糖鎖欠失体および糖鎖付加体からなる群より選ばれる前記 (23) ~ (25) のいずれか 1 項に記載の方法。

(27) 低分子化合物が少なくとも 1 個の前記 (1) ~ (12) および (14) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の化合物で直接またはスペーサーを介して修飾された化学修飾低分子化合物。

(28) 前記 (27) 記載の化学修飾低分子化合物を含有する医薬。

(29) 前記 (1) ~ (12) および (14) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の化合物で低分子化合物を化学修飾することを特徴とする、該低分子化合物の安定性または水溶性を向上させる方法。

(30) 前記 (1) ~ (12) および (14) ~ (17) のいずれか 1 項に記載の化合物を含有することを特徴とする生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物の化学修飾剤。

式 (1) において、 R^1 は水素原子または水素原子に変換可能な基を表し、水素原子に変換可能な基としては、例えば置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の脂環式複素環基、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のシリル、置換もしくは非置換のアシル等があげられ、 R^1 としては、中でも水素原子またはベンジルが好ましい。

低級アルキルとしては、例えば炭素数 1~8 の、直鎖状または分岐状のアルキル、より具体的にはメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル等があげられる。

脂環式複素環基としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも 1 個の原子を含む 3~8 員の単環性脂環式複素環基、3~8 員の環

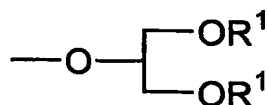
が縮合した二環または三環性で窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも 1 個の原子を含む縮環性脂環式複素環基等があげられ、より具体的にはテトラヒドロピリジニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロベンゾフラニル、ピロリジニル、ピペリジノ、ピペリジニル、パーヒドロアゼピニル、パーヒドロアゾシニル、モルホリノ、モルホリニル、チオモルホリノ、チオモルホリニル、ピペラジニル、ホモピペリジノ、ホモピペラジニル、ジオキサラニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、インドリニル、イソインドリニル、2-ピロリニル、2-ピロリドニル、3-ピロリドニル、2-ピペリドニル、3-ピペリドニル、4-ピペリドニル、パーヒドロ-2-アゼピノニル、パーヒドロ-3-アゼピノニル、パーヒドロ-4-アゼピノニル、2-チアゾリドニル、4-チアゾリドニル、2-オキサゾリドニル、4-オキサゾリドニル、フタルイミド、グルタルイミド、ヒダントイニル、チアゾリジンジオニル、オキサゾリジンジオニル等があげられる。

アラルキルとしては、例えば炭素数 7~13 のアラルキル、より具体的にはベンジル、フェネチル、ベンズヒドリル、ナフチルメチル等があげられる。

アシルとしては、例えば炭素数 1~8 の、直鎖状、分岐状または環状のアシル、より具体的にはアセチル、プロピオニル、ベンゾイル等があげられる。

置換低級アルキル、置換脂環式複素環基、置換アラルキル、置換シリルおよび置換アシルの置換基としては、例えば同一または異なって、置換数 1~3 の、より具体的には低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシ低級アルコキシ、アラルキルオキシ等があげられる。ここで、低級アルキル、低級アルコキシおよび低級アルコキシ低級アルコキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義であり、アラルキルオキシのアラルキル部分は、前記アラルキルと同義である。

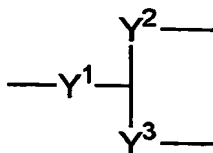
式 (1) において、X は、R および n 個の



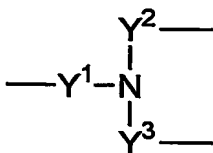
と結合することができる基であれば、特に限定されることはないが、1 以上の直列的分岐構造を有することが好ましい。ここで、直列的分岐構造とは、2 つ以上に分岐した分岐鎖の少なくとも 1 つの分岐鎖が、さらに 2 つ以上分岐し、これが

繰り返される構造を意味する。中でも、2 つ以上に分岐した分岐鎖のそれぞれが、さらに 2 つ以上に分岐し、これが繰り返される構造が好ましい。さらに、それぞれの分岐数は 2 であるのが好ましい。

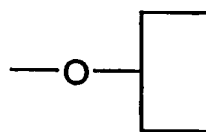
分岐構造としては、



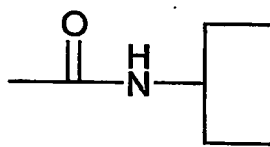
または



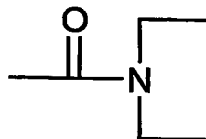
(式中、Y¹、Y²および Y³はそれぞれ前記と同義である) が好ましく、中でも



(以下、グリセロールユニットと称する)、

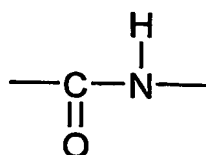


または



がより好ましい。これら分岐構造の式(1)における含有数は、特に限定されることはないが、1個以上($n-1$)個以下が好ましく、 n が 2^m である場合は中でも1個以上(2^m-2)個以下がより好ましい。

さらに、式(1)において、 X が1個以上($n-1$)個以下の、 n が 2^m である場合は1個以上(2^m-2)個以下の



で表される構造を含有する化合物も好ましい。

Y^1 、 Y^2 および Y^3 の定義のうち、アルキレンとしては、例えば炭素数1~8の、直鎖状、分岐状または環状のアルキレン、より具体的にはメチレン、エチレン、 n -プロピレン、イソプロピレン、 n -ブチレン、イソブチレン、*sec*-ブチレン、*tert*-ブチレン、ペンチレン、ネオペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、シクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンチレン、シクロヘキシレン、シクロペンチレン、シクロオクチレン等があげられる。

置換アルキレンにおける置換基としては、例えば同一または異なって、置換数1~3の、より具体的にはハロゲン原子、低級アルキル、不飽和炭化水素基、アリール、低級アルコキシ、水酸基、オキシ、カルボキシ、アシル、アミノ、ニトロ、シアノ、複素環基等があげられる。ここで、ハロゲン原子としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子があげられる。不飽和炭化水素基としては、例えば炭素数1~8の、直鎖状、分岐状または環状の不飽和炭化水素基、より具体的にはビニル、アリル、1-プロペニル、メタクリル、2-ブテニル、1-ペンテニル、2-ヘキセニル、1,3-ペンタジエニル、1,3-ヘキサジエニル、シクロペンテニル、シクロペンタジエニル、プロパルギル、ペンチニル等のアルケニルおよびアルキニルがあげられる。アリールとしては、例えば炭素数6~14のアリール、より具体的にはフェニル、ナフチル、アントラニル等があげられる。複素環基としては、例えば窒素原子、酸素原子、硫黄原子等のヘテロ原子の少なくとも一つを含有する3~8員環の複素環基等があげられ、より具体的にはフリル、チエニル、ピロリル、ピリジル、オキサゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、ピリミジニル、ト

リアジニル、インドリル、キノリル、プリニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイミダゾリル等があげられる。低級アルキルおよび低級アルコキシはそれぞれ前記と同義である。

置換イミノにおける置換基としては、例えば低級アルキル、アリール、アラルキル等があげられる。低級アルキル、アリールおよびアラルキルはそれぞれ前記と同義である。

式(1)において、R は反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基であり、R の部分構造である反応性を有する基は、生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物中のカルボキシ、アミノ、水酸基、メルカプト、ホルミル、ホスホノ等と反応することが可能であればいかなる基でもよい。具体的には、ポリペプチド中のリジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン等の各アミノ酸の側鎖、N 末端アミノ基、C 末端カルボキシル基、ポリペプチドに結合した糖鎖等との反応性を有する基があげられる。

反応性を有する基として、好ましくは、カルボン酸活性エステル残基、カーボネート、マレイミド、メルカプト、ホルミル、トレシル、イソシアナート、酸無水物残基、酸ハロゲン化物残基、ビニルスルホニル、ヒドラジド、アミノ、ハロゲン等があげられる。

反応性を有する基に変換可能な基として、好ましくは、水酸基、カルボキシ、アミノ、メルカプト、ホルミル、ビニル、ホスホノ、ハロゲン等があげられる。

カルボン酸活性エステル残基におけるカルボン酸活性エステルとしては、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基等を有するエステルが好ましく、具体的には N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、p-ニトロフェニルエステル、チオフェニルエステル、2,3,5-トリクロロフェニルエステル、2,4,6-トリクロロフェニルエステル、2,4,5-トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、2,4-ジニトロフェニルエステル、N-ヒドロキシフタルイミドエステル等があげられる。

酸無水物残基における酸無水物としては、具体的にはカルボン酸の無水物等があげられる。

酸ハロゲン化物残基としては、具体的にはカルボニルクロライド、カルボニルプロマイド、カルボニルアイオダイド、カルボニルフルオライド等があげられる。

反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基以外の R 部分は、該反応性を阻害しない基であれば特に限定されず、任意の基であってよく、具体的には、ハロゲン原子、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換の不飽和炭化水素基、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアルコキシ、水酸基、カルボニル、カルボキシ、置換もしくは非置換のアシル、置換もしくは非置換のアミノ、置換もしくは非置換のイミノ、ニトロ、シアノ、O、S、スルフィニル、スルホニル、置換もしくは非置換の複素環基等からなる群より選ばれる一つまたは同一もしくは異なった複数の任意の組み合わせ等を含有することができる。中でも、置換もしくは非置換のアルキレン、カルボニル、置換もしくは非置換のイミノ、O および S からなる群より選ばれる一つまたは同一もしくは異なった複数の任意の組み合わせを含有するものが好ましい。

R のアルキルおよびアルコキシのアルキル部分としては、例えば炭素数 1~8 の、直鎖状、分岐状または環状のアルキル、より具体的にはメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等があげられる。

不飽和炭化水素基、アルキレン、ハロゲン原子および複素環基は、それぞれ前記 Y¹、Y² および Y³ の定義において記載されている不飽和炭化水素基、アルキレン、ハロゲン原子および複素環基と同義である。

アリールとしては、例えば炭素数 6~14 のアリール、より具体的にはフェニル、ナフチル、ビフェニル、アントラニル等があげられる。

アシルは、前記 R¹ の定義で記載されているアシルと同義である。

置換アルキル、置換不飽和炭化水素基、置換アルキレン、置換アリール、置換アルコキシ、置換アシルおよび置換複素環基における置換基としては、例えば同一または異なって、置換数 1~3 の、より具体的にはハロゲン原子、アルキル、不飽和炭化水素基、アリール、アルコキシ、水酸基、オキシ、カルボキシ、アシ

ル、アミノ、ニトロ、シアノ、複素環基等があげられ、ハロゲン原子、アルキル、不飽和炭化水素基、アリール、アルコキシ、アシルおよび複素環基はそれぞれ前記と同義である。

置換イミノにおける置換基としては、例えばアルキル、不飽和炭化水素基、アリール、アルコキシ、アシル、アミノ、複素環基等があげられ、置換アミノにおける置換基としては、例えば同一または異なって、置換数 1~2 の、より具体的にはアルキル、不飽和炭化水素基、アリール、アルコキシ、アシル、アミノ、複素環基等があげられ、アルキル、不飽和炭化水素基、アリール、アルコキシ、アシルおよび複素環基はそれぞれ前記と同義である。

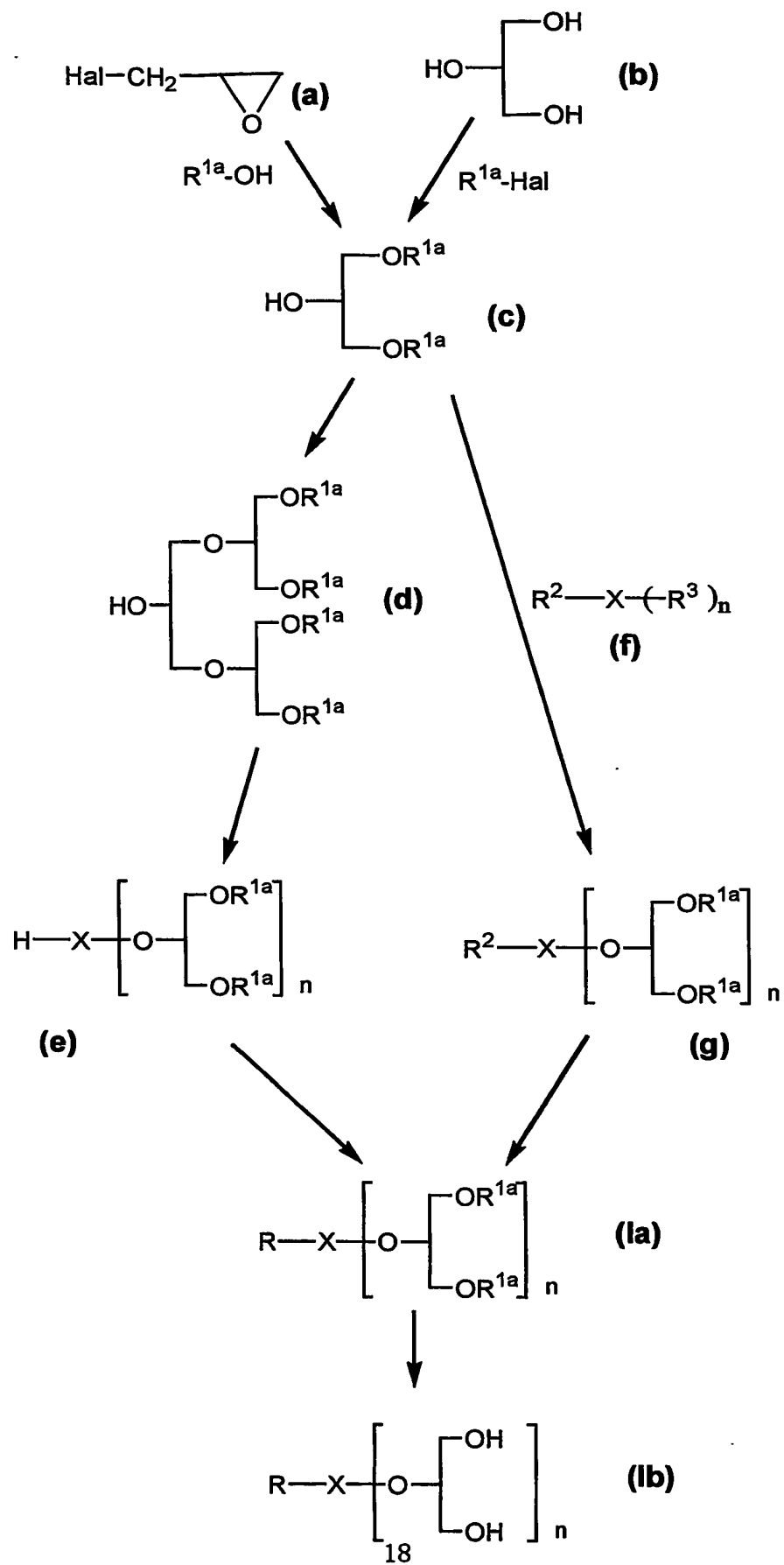
式 (1) において、 n は 3 以上の整数であれば特に限定されることはないが、好ましくは 2^m (式中、 m は前記と同義である)、さらに好ましくは $4 \sim 1024$ ($2^2 \sim 2^{10}$) である。

本発明の化合物は、単一化合物であっても、構造の異なる化合物の混合物であってもよいが、単一化合物が好ましい。

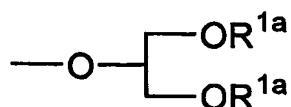
式 (1) で表される化合物は、その分子量が特に限定されることはないが、好ましくは $100 \sim 1,000,000$ 、さらに好ましくは $1,000 \sim 100,000$ の分子量を有する。

式 (1) で表される化合物において、代表的な具体例として、前記式 (2)、(3)、(4)、(5) 等で表される化合物があげられる。

式 (1) で表される化合物は、通常の有機合成法で知られている反応 [日本化学会編、有機合成 I~IV、丸善 (1992 年)] 等を組み合わせて製造することができる。例として、以下の一般的な製造方法があげられる。

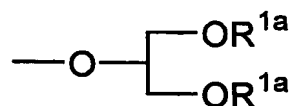


[式中、R、X および n はそれぞれ前記と同義であり、Hal はハロゲン原子を表し、 R^{1a} は水素原子に変換可能な基を表し、 R^2 は R に変換可能な基を表し、 R^3 は

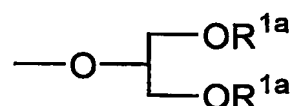


(式中、 R^{1a} は前記と同義である) と置換可能な基を表す]

ハロゲン原子および水素原子に変換可能な基はそれぞれ前記と同義であり、R に変換可能な基としては、R に変換可能な基であれば特に限定されず、水素原子に変換可能な基の定義で記載したものと同様なものがあげられる。



(式中、 R^{1a} は前記と同義である) と置換可能な基としては、



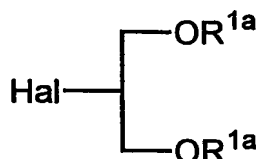
(式中、 R^{1a} は前記と同義である) と置換可能な基であれば特に限定されないが、具体的には、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、アルコキシ、アルカノイルオキシ等があげられ、ハロゲン原子は前記と同義であり、アルコキシおよびアルカノイルオキシのアルキル部分は、前記アルキルと同義である。

エピクロロヒドリン、エピブロモヒドリン、エピフルオロヒドリン等のエピハロヒドリン (化合物 (a)) と $R^{1a}\text{---OH}$ (式中、 R^{1a} は前記と同義である) を用い、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー (J. Org. Chem.), 57, 435 (1992 年)、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.), 38(10), 1673 (1995 年) 等に記載の方法に順じて、化合物 (c) を得ることができる。また、化合物 (c) は、グリセロール (化合物 (b)) 1 モルに対し、1 ~10 モルの $R^{1a}\text{---Hal}$ (式中、 R^{1a} および Hal はそれぞれ前記と同義である) を用いて適当な塩基存在下で反応させた後に精製して得るか、または触媒量の $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ 存在下で 2-メチル-1-ブテンと反応させて [テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Lett.), 29, 2951 (1988 年)]、選択的に第一アルコールの水酸

基を保護するか、またはテトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Lett.), 41, 6441 (2000)、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー (J. Org. Chem.), 54, 1346 (1989)、カナディアン・ジャーナル・オブ・ケミストリー (Can. J. Chem.), 62, 241 (1984) 等に記載の方法に順じて得ることができる。さらに、化合物 (c) は化合物 (b) の第一アルコールの水酸基を、例えばプロテクティブ・グループ・イン・オーガニック・シンセシス第三版 (Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン (T. W. Greene) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999 年) 等に記載の保護基の導入方法等に準じて保護することでも得られる。

化合物 (a) と反応させる $R^{1a}-OH$ としては、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、tert-ブチルアルコール、ベンジルアルコール等、種々のアルコール類が利用可能である。また、化合物 (b) と反応させる $R^{1a}-Hal$ の R^{1a} としては、ベンジル、メチル、エチル、プロピル、tert-ブチル、メトキシメチル、メトキシエトキシメチル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシメチル、トリエチルシリル等の除去可能な残基が利用可能である。化合物 (a) および (b) としては市販品を利用することができ、化合物 (c) は前記の方法にしたがって合成して得られるか市販品として得ることもできる。

次いで、前記工程で得られた化合物 (c) を、さらに化合物 (a) と反応させるか、化合物 (b) を



(式中、Hal および R^{1a} はそれぞれ前記と同義である) と反応させることによって、化合物 (d) が得られる。

この反応工程を繰り返すことによって、X が直列的分岐構造を有し、X に化合物 (c) 残基が n 個結合した化合物 (e) を得ることができる。

化合物 (e) に存在する X 末端の水酸基に通常の有機合成反応を利用して反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基 R を結合させるか、該水酸基を、反応性を有する残基に直接変換することで、化合物 (I a) を得ることができる。

一方、化合物 (f) に、前記と同様にして合成した化合物 (c) を反応させ、化合物 (g) を得ることができる。化合物 (f) と化合物 (c) を反応させ、化合物 (g) を得る方法としては、化合物 (f) の R^3 の部位と化合物 (c) の置換反応、通常の有機合成法で知られている反応 [日本化学会編、有機合成 I~IV、丸善 (1992 年) 等] を組み合わせた方法等があげられる。化合物 (g) の R^2 を通常の有機合成反応を利用して反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基 R に変換することで、化合物 (I a) が得られる。化合物 (f) としては市販の既知構造の化合物を利用することもできるし、通常の有機合成法で知られている反応 [日本化学会編、有機合成 I~IV、丸善 (1992 年) 等] を組み合わせて化合物 (f) を調製することもできる。

化合物 (I a) を、通常の有機合成反応に用いられる保護基の除去反応 [例えばプロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第三版 (Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン (T. W. Greene) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999 年) 等] に付して、 R^1 を除去して、水素原子に置換することで化合物 (I b) が得られる。

また、これとは逆に、式 (1) において、X とは反対方向に $-OR^1$ 末端からグリセロールユニットを伸ばしていくことにより、本発明の化合物を製造することも可能である。

各反応工程は適当な溶媒、好ましくはジクロロメタン、クロロホルム、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、ピリジン、水、およびこれらの混合溶媒の中から任意に選択される溶媒中、 $-20 \sim 150^\circ\text{C}$ の間の温度で 1 時間~数日間行われる。

各工程において得られる各化合物はそのままの純度で、または再結晶、溶媒抽出、シリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー等の一般的な精製方法で任意の純度に精製して次の工程に使用され得る。

本発明の化合物は、例えば生理活性ポリペプチド、低分子化合物等の安定性または水溶性を向上させる目的で化学修飾剤として使用することができる。

具体的には、本発明の化合物と生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物中のカルボキシ、アミノ、水酸基、メルカプト、ホルミル、ホスホノ等とを直接、またはスペーサーを介して結合させることにより上記目的を達成することができる。

スペーサーとしてはアミノ酸やペプチドが好ましいが、本発明の化合物と生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物中のカルボキシ、アミノ、水酸基、メルカプト、ホルミル、ホスホノ等とを結合することができればそれ以外であってもよい。アミノ酸としてはリジン、システイン等の天然アミノ酸等を用いることができ、オルニチン、ジアミノプロピオン酸、ホモシステイン等を用いることもできる。より好ましくは、システインがあげられる。ペプチドとしては、アミノ酸残基 2~10 からなるものが好ましい。アミノ酸およびペプチド以外のスペーサーとしては、グリセロール、エチレングリコール、糖等があげられる。ここで、糖としては、グルコース、ガラクトース、ソルボース、ガラクトサミン、ラクトース等の単糖類や二糖類等があげられる。

これらのスペーサーは、例えば、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体中のリジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン等の残基の側鎖とアミド結合、チオエーテル結合、エステル結合等を介して結合するか、該ポリペプチドまたは該その誘導体の C 末端カルボキシル基とアミド結合やエステル結合するか、該ポリペプチドまたは該その誘導体の N 末端アミノ基とアミド結合する。これらの結合は、通常のペプチド合成法〔泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（1985 年）〕や遺伝子組換え法を用いて行うことができる。

この場合、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体を合成すると同時に例えば該生理活性ポリペプチドまたはその誘導体の C 末端カルボキシル基にスペーサーとなるアミノ酸、ペプチド等を導入することが望ましいが、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体を合成した後にスペーサーを結合してもよい。また、該ポ

リペプチドまたはその誘導体の C 末端カルボキシル基等を化学合成的に活性化してスパーサーに結合することもできる。また、本発明の化合物を予め結合したスパーサーを前記の方法で生理活性ポリペプチドまたはその誘導体に結合することもできる。

本発明で用いられる生理活性ポリペプチドまたはその誘導体としては、酵素、サイトカイン、ホルモン、毒素、抗体およびそれらの誘導体等があげられる。

生理活性ポリペプチドとしては、例えば、アスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide Disumutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine Deaminase)、インターロイキン-1~24 (Interleukin-1~24)、インターフェロン- α (Interferon- α)、インターフェロン- β (Interferon- β)、インターフェロン- γ (Interferon- γ)、インターフェロン- ω (Interferon- ω)、インターフェロン- τ (Interferon- τ)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、エリスロポエチン (Erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、クローソ (Klotho) 蛋白質、レプチン (Leptin)、繊維芽細胞増殖因子 1~19 (Fibroblast Growth Factor-1~19)、ミッドカイン (Midkine)、カルシトニン (Calcitonin)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、グルカゴン (Glucagon)、インスリン (Insulin)、インスリン様成長因子 1 (Insulin-like Growth Factor-1)、オステオジェニックプロテイン 1 (Osteogenic Protein-1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Growth Factor)、アミリン (Amylin)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon-like Peptide)、成長ホルモン (Growth Hormone)、ナトリウム利尿ペプチド類 (Natriuretic Peptide)、プラスミノゲン (Plasminogen)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、エンドスタチン (Endostatin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、肝細胞成長因子

(Hepatocyte Growth Factor)、リシン (Ricin)、シュードモナス外毒素 (Pseudomonas Exotoxin)、ジフテリア毒素 (Diphtheria Toxin)、それらの溶解性レセプター等があげられる。

本発明で使用される抗体は、公知の手段 [アンティボディーズ ア ラボラトリー マニュアル、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) (1988)] を用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

本発明で使用される抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましい。

本発明で使用されるモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片等があげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相補性決定領域 (以下、CDR と称す) 移植抗体等があげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域 (以下、重鎖は H 鎖として、可変領域は V 領域として VH と称す) および軽鎖可変領域 (以下、軽鎖は L 鎖として VL と称す) とヒト抗体の重鎖定常領域 (以下、定常領域は C 領域として CH と称す) およびヒト抗体の軽鎖定常領域 (以下、CL と称す) とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であればいかなるものも用いることができる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の H 鎖、L 鎖の V 領域の CDR のアミノ酸配列をヒトの抗体の H 鎖、L 鎖の V 領域の適切な位置に移植した抗体を意味する。

抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (以下、scFv と称す)、ジスルフィド安定化 V 領域断片 (以下、dsFv と称す)、CDR を含むペプチド等があげられる。

Fab は、IgG のヒンジ領域で 2 本の H 鎖を架橋している 2 つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパイニンで分解して得られた、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体で構成された、分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

Fab' は、下記 $F(ab')_2$ のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

$F(ab')_2$ は、IgG のヒンジ領域の 2 個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2 つの Fab 領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約 10 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

scFv は、一本の VH と一本の VL とを適当なペプチドリンカー（以下、P と称す）を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドを示す。本発明で使用する scFv に含まれる VH および VL としては、本発明のモノクローナル抗体またはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、ジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 [プロテイン エンジニアリング (Protein Engineering), 7, 697 (1994 年)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれる VH または VL としてはモノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明で使用する抗体またはその抗体断片には、該抗体またはその抗体断片に、放射性同位元素、蛋白質、薬剤等を、化学的または遺伝子工学的に結合させた融合抗体も含まれる。

本発明で使用する生理活性ポリペプチドの誘導体としては、前記生理活性ポリペプチドのアミノ酸欠失体、アミノ酸置換体、アミノ酸挿入体、アミノ酸付加体、糖鎖欠失体、糖鎖付加体等があげられる。これらの誘導体は、生理活性ポリペプチドが有する活性を同様に有していることが好ましい（以下、生理活性ポリペプチドとその誘導体を合わせて、「生理活性ポリペプチド」と表記する）。

本発明で使用する低分子化合物としては、式 (1) で表される化合物における R の一部と反応し、R の一部と置換可能なものであれば特に限定されないが、例えば、カルボキシ、一級または二級アミノ、水酸基、メルカプト、ホルミル、ホスホノ、カルボン酸活性エステル残基、酸無水物残基、ハロゲン、酸ハロゲン化物残基、イソシアナート、マレイミド、ヒドラジド、ビニルスルホニル等の官能基を有する化合物があげられる。

低分子化合物としては、低分子化合物であればいかなる化合物も利用可能である。低分子化合物の分子量は、特に限定されないが、50～10000 であるのが好ましく、100～2000 であるのがさらに好ましい。また、水または水溶液への溶解度が、0～1mol/L、好ましくは 0～0.1mol/L であり、その溶解度の値が少なくとも 1.1 倍以上、好ましくは 10～10³ 倍に向上することが求められる水溶性が不十分な低分子化合物が好ましい。低分子化合物の例としては、コレステロール、ジヒドロコレステロール、ラノステロール、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴカステロール、フコステロール等のステロール類、シトシンアラビノシド、ドキソルビシン、ダウノルビシン、アクリルピシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、5-フルオロウラシル、デュオカルマイシン、メトトレキセート、カンプトテシン、タキサン類等の抗癌剤、アンピシリン、セファレキシン、セファクロル、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、アンホテリシン、ペニシリン、セファゾリン等の抗生物質、ガンシクロビル、アシクロビル等の抗ウイルス剤、これらの誘導体等があげられる。上記誘導体としては、任意の官能基が欠失、置換、挿入、または付加した修飾体、放射性同位元素、薬剤、糖等による修飾体等があげられ、未修飾の低分子化合物が有する活性を同様に有していることが好ましい。

これらの生理活性ポリペプチドまたは低分子化合物は、りん酸緩衝液、ほう酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の緩衝液もしくは水、または N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジオキサン、テトラヒドロフラン等の適当な有機溶媒中、またはこれらの有機溶媒と水溶液との混合溶媒中で製造され、化学修飾反応に用いられる〔稲田祐二・前田浩編、続蛋白質ハイブリッド、共立出版（1988 年）参照〕。

これらの生理活性ポリペプチドまたは低分子化合物を本発明の化合物で化学修飾すると、1 分子以上の化合物が結合した化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物等が得られる。

生理活性ポリペプチドまたは低分子化合物の化学修飾は、本発明の化合物を生理活性ポリペプチドまたは低分子化合物 1 モルあたり 1～1000 モル程度、好ましくは 1～50 モル程度用いて反応させることによって行われる。化合物の生理活性ポリペプチドまたは低分子化合物への修飾の度合いは生理活性ポリペプチドまた

は低分子化合物に対する化合物のモル比、反応温度、pH、反応時間等を調節することによって、任意に選択することができる。また、反応に使用する溶媒は反応を妨害しないものであればいずれでもよく、例えばりん酸緩衝液、ほう酸緩衝液、トリスー塩酸緩衝液、炭酸水素ナトリウム水溶液、酢酸ナトリウム緩衝液、クエン酸緩衝液、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、メタノール、アセトニトリル、ジオキサン、テトラヒドロフラン等、およびこれらの混合溶媒から選択される。反応の温度、pH および時間は生理活性ポリペプチドまたは低分子化合物の活性が損われない条件であればいずれでもよく、例えば 0～50℃の間の温度、10 分間～100 時間、pH4～10 が好ましい。

本発明の化合物で修飾された生理活性ポリペプチドまたは低分子化合物の精製は常法に従って、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、限外濾過等により行うことができる。また、任意の化学修飾率の化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物等をこれらの精製法で分画して精製することもできる。

合成または精製された生理活性ポリペプチドまたは低分子化合物および本発明の化合物で修飾された該生理活性ポリペプチドまたは該低分子化合物の構造の確認は、質量分析、核磁気共鳴 (NMR) およびアミノ酸分析計によるアミノ酸組成分析により、また気相プロテインシーケンサーによりエドマン分解して得られたフェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸を逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析することによるアミノ酸配列分析等により行うことができる。

前記で調製された化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物は診断薬、治療剤等の医薬として利用することができる。これらの治療剤には、生物活性の維持・向上、細網内皮系 (RES) 回避、血中持続性の向上、薬剤の円滑なリリース、毒性低減に加えて、抗原性・免疫原性の低下、水溶性の向上、プロテアーゼ耐性、立体構造の保持、血清中での安定化、会合体形成抑制等の効果が期待される。

これらの化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物の投与方法としては、具体的には、静脈内投与、経口投与等があげられるが、該投与方法はこれらに限定されない。

これらの化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物を含有する医薬品組成物は、例えば製薬上許容される非経口用媒介物と組み合わせられた溶液、サスペンション、エマルジョン、凍結乾燥製剤等として表される。該媒介物としては、水、塩水、リンガー液、デキストロース溶液、1～10%ヒト血清アルブミン等があげられる。該媒介物は等張性を保持するために塩化ナトリウム、マンニトール、アミノ酸類等の添加剤を含んでいてもよいし、化学安定性を保持するために緩衝液、防腐剤等を含んでいてもよい。該医薬品組成物は通常用いられている方法に従って滅菌されるのが好ましい。注射投与に適した非経口用該医薬品組成物は、前記化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物、添加剤等を例えば0.9%塩化ナトリウム含有水溶液に溶解することによって調製される。該医薬品組成物は単回または複数回投与されうる。該医薬品組成物は単一の治療薬として、または他の治療薬と組み合わせ投与されうる。該医薬品組成物による治療は、従来の治療と組み合わせることもでき、この場合、連続もしくは同時投与によってなされる。

これらの化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物を含有する医薬品組成物は、また、製薬上許容される伝統的な割賦剤もしくは基材と組み合わせられたタブレット、ピル、またはカプセルとして表すこともできる。該割賦剤もしくは基材は、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウムのような伝統的な賦形剤を含んでいてもよい。

投与量または投与回数は、使用される化学修飾ポリペプチドまたは化学修飾低分子化合物、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常有効成分を成人1日当たり10 μ g/kg～8mg/kg投与する。

以下に、本発明を試験例、実施例および参考例により説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない

図面の簡単な説明

第1図は、本発明化合物修飾 G-CSF 誘導体、ポリエチレングリコール修飾 G-CSF 誘導体および未修飾 G-CSF 誘導体の、温度上昇に伴う円二色性偏光スペクトル（楕円率）の変化を示した図である。横軸は温度（℃）を、縦軸は分子楕円率（a. u.）を表し、各プロットの意味は、以下のとおりである。

- 1：未修飾 G-CSF 誘導体
- 2：ポリエチレングリコール修飾 G-CSF 誘導体
- 3：本発明化合物修飾 G-CSF 誘導体

発明を実施するための最良の形態

試験例 1 化学修飾 G-CSF 誘導体の生物活性測定

実施例 1、参考例 1 または参考例 2 で調製した各 G-CSF 誘導体のマウス白血病細胞 NFS60 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 82, 6687 (1985 年)] に対する増殖促進活性を、浅野らの方法 [薬理と治療, 19, 2767 (1991 年)] に従って測定した。未修飾の G-CSF 誘導体の比活性 (U/mg) を 100 としたときの各化合物の活性を表 1 に示す。従来のポリエチレングリコール修飾体の比活性は顕著に低下したが、式 (2) で表される本発明の化合物を用いて作製された修飾体では修飾率が高いにも関わらず極めて高い生物活性が維持された。

表 1 化学修飾 G-CSF 誘導体の活性

サンプル名	相対比活性 (%)
実施例 2 の化合物 7 修飾 G-CSF 誘導体	75
参考例 1 の G-CSF 誘導体	100
参考例 2 のポリエチレングリコール修飾 G-CSF 誘導体	18

試験例 2 化学修飾 G-CSF 誘導体の熱安定性

未修飾 G-CSF 誘導体ならびに各化学修飾 G-CSF 誘導体を 50mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、0.2mg/mL に調整し、温度上昇変化に伴う円二色性偏光 (CD) スペクトルの変化を測定した。波長 208nm におけるスペクトル値 (楕円率) の変化を図 1 に示す。未修飾 G-CSF 誘導体では 50~55℃で急速に楕円率 (絶対値) の低下、消失が確認され、この変化は不可逆的であった。一方、本発明の化合物修飾 G-CSF 誘導体ではポリエチレングリコール修飾体と同様に楕円率は 55℃まではほぼ一定であり、75℃まで温度を上昇させても楕円率 (絶対値) は僅かに低下

したのみであった。この結果は、本発明の化合物修飾体が温度を上昇させても水溶液中で安定に構造を維持した状態で存在していることを示している。

試験例 3 化学修飾低分子化合物の水に対する溶解度

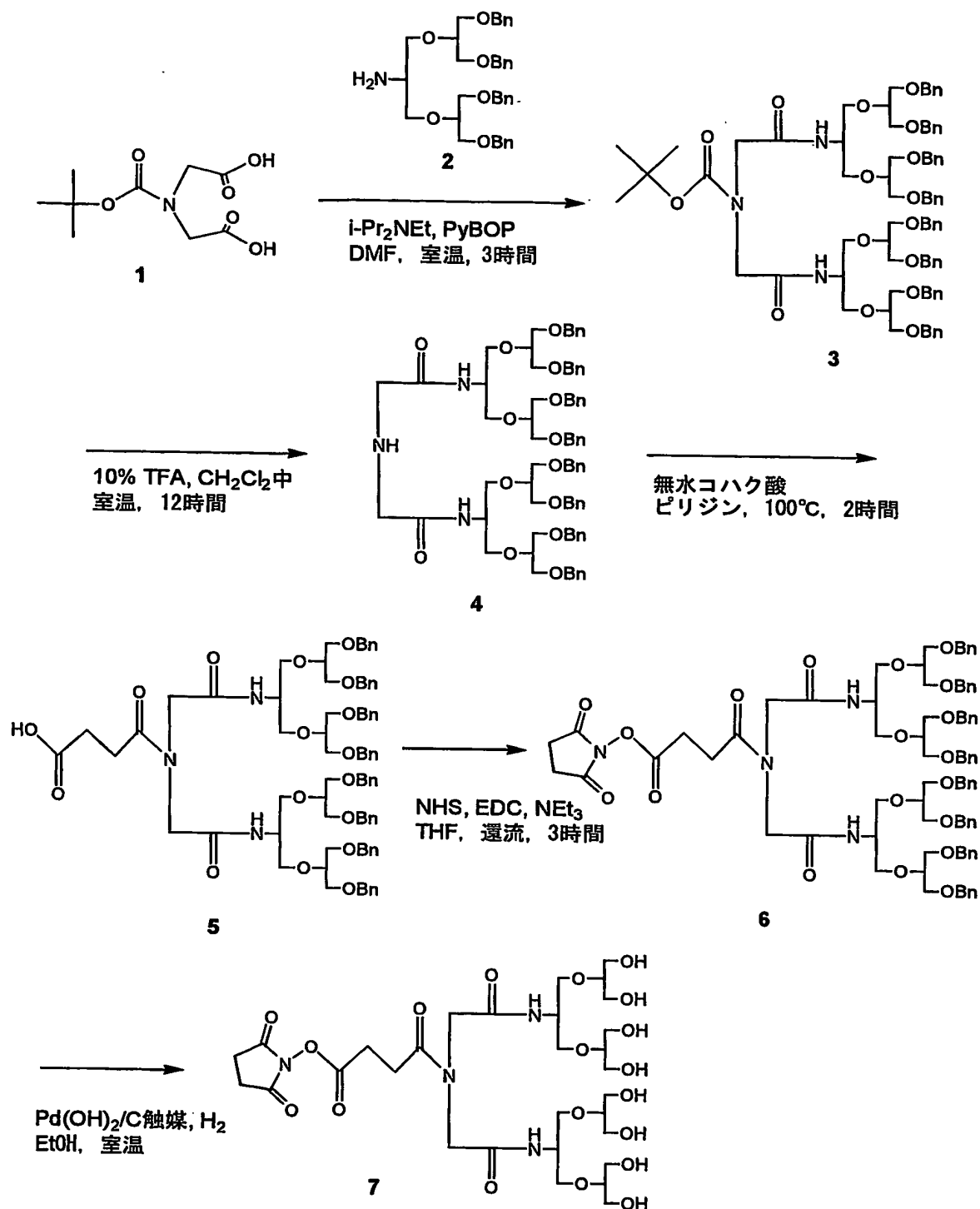
実施例 4 および実施例 5 で調製した化合物の水に対する溶解度を測定したところ、表 2 に示す結果が得られた。これらの結果から、実施例 1 で調製した化合物を難溶性の低分子化合物に結合させると、水に対する溶解度が向上することが明らかとなった。

表 2

実施例	化合物番号	飽和水溶液濃度 (mol/L)
4	2 6 a	0.65×10^{-2}
	2 7 a	0.35
	2 8 a	> 3.3
5	2 6 b	0.09
	2 7 b	0.41
	2 8 b	> 0.80

実施例 1 化合物の合成 [式 (2) で表される化合物]

反応スキームを以下に示す。反応スキーム中で、Bn はベンジル基、Et はエチル基、i-Pr はイソプロピル基、PyBOP はベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ピロリジノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフィン、TFA はトリフルオロ酢酸、NHS は N-ヒドロキシスクシンイミド、EDC は 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、THF はテトラヒドロフラン、DMF はジメチルホルムアミドを表す。



化合物 2 [2-アミノ-1,3-ビス(1,3-ジ-*O*-ベンジル-2-グリセロキシ)プロパン] を根本らの方法 [ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.) , 38, 1673 (1995 年)] に従って調製した。化合物 1 (3.5g, 15.0mmol) のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (50mL) に、室温でジイソプロ

ピルエチルアミン (10.5mL, 60.0mmol)、化合物 2 (19.8g, 33.0mmol) の DMF 溶液 (20mL) およびベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ピリジノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフィン (PyBOP ; 15.6g, 30.0mmol) を順次加えた後、同温度で 15 時間攪拌した。反応液を 5%硫酸水素カリウム水溶液に注いだ後、酢酸エチルを用いて抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル=3 : 2) で精製し、淡黄色油状の化合物 3 (18.7g, 収率 89%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 1.36 (9H, s), 3.40–3.81 (32H, m), 4.16 (2H, m), 4.48 (16H, s), 7.19–7.31 (40H, m).

化合物 3 (2.0g, 1.43mmol) のジクロロメタン溶液 (45mL) に、室温でトリフルオロ酢酸 (5mL) を注入した後、同温度で 20 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過した後、溶媒を減圧下で留去し、淡黄色油状の化合物 4 (1.19g, 収率 64%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 1.75 (1H, s), 2.87 (4H, s), 3.47–3.81 (28H, m), 4.16 (2H, m), 4.48 (16H, s), 7.00 (2H, d), 7.19–7.31 (40H, m).

化合物 4 (1.5g, 1.16mmol) のピリジン溶液 (2.0mL) に、室温で無水コハク酸 (232mg, 2.31mmol) をゆっくりと加えた後、100°C で 1.5 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、2mol/L 塩酸を加え、ジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル=1 : 3) で精製し、淡黄色油状の化合物 5 (1.62g, 収率 100%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 2.39 (2H, m), 2.56 (2H, m), 3.45–3.76 (32H, m), 4.09–4.21 (2H, m), 4.46 (16H, s), 6.87 (1H, d), 7.19–7.31 (40H, m), 8.02 (1H, d).

化合物 5 (3.0g, 2.15mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (45mL) に、室温で N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS ; 495mg, 4.30mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC ; 886mg, 4.30mmol) およびトリ

エチルアミン (0.24mL, 1.72mmol) を順次加えた後、2 時間還流した。反応液に 5%硫酸水素カリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=1：10) で精製し、淡黄色油状の化合物 6 (2.35g, 収率 79%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 2.49 (2H, t), 2.67 (4H, s), 2.78 (2H, t), 3.40-3.78 (32H, m), 4.11-4.22 (2H, m), 4.48 (16H, d), 6.96 (1H, d), 7.19-7.31 (40H, m), 8.37 (1H, d).

化合物 6 (1.15g, 0.77mmol) のエタノール溶液 (50mL) に水素気流下、室温で $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (Pd : 20 重量%含有, 200mg) を加えた後、同温度で 12 時間攪拌した。反応液をセライトで濾過した後、溶媒を減圧下で留去し、淡黄色油状の化合物 7 (596mg, 収率 100%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 2.74 (2H, t), 2.82 (4H, s), 2.96 (2H, t), 3.30 (8H, s), 3.43-3.80 (28H, m), 4.05-4.22 (6H, m).

実施例 2 本発明化合物で修飾された化学修飾 G-CSF 誘導体の調製

等張りん酸緩衝液 (pH 7.4) で調製した参考例 1 の G-CSF 誘導体 (27.8mL, 0.72mg/mL) に、実施例 1 で調製した化合物 7 (約 20mg) を加え、冷蔵下で一昼夜攪拌して反応させた。反応液 (26.5mL) を 20mmol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5) で 10 倍に希釈し、CM Sepharose FF レジン 10mL (Amersham-Pharmacia Biotech 社製) を用いた陽イオン交換カラムで精製した。0.3mol/L の塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出される目的画分を回収し、2.1mg/mL の化合物 7 修飾 G-CSF 誘導体を含む溶液 (8mL, 収率 84%) を得た。

<SDS-PAGE 分析>

分析条件: 4-20%グラジエントゲル (PAGEL SPG-520L)、非還元

結果: 21kDa~31kDa の間に均一なバンド

<ゲル濾過 HPLC 分析>

分析条件：TSK gel G2000SW_{XL} カラム (7.8×300mm、東ソー社製)、流速 0.5mL/分、
溶媒 150mmol/L 食塩を含む 20mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)、注入量
50 μ g

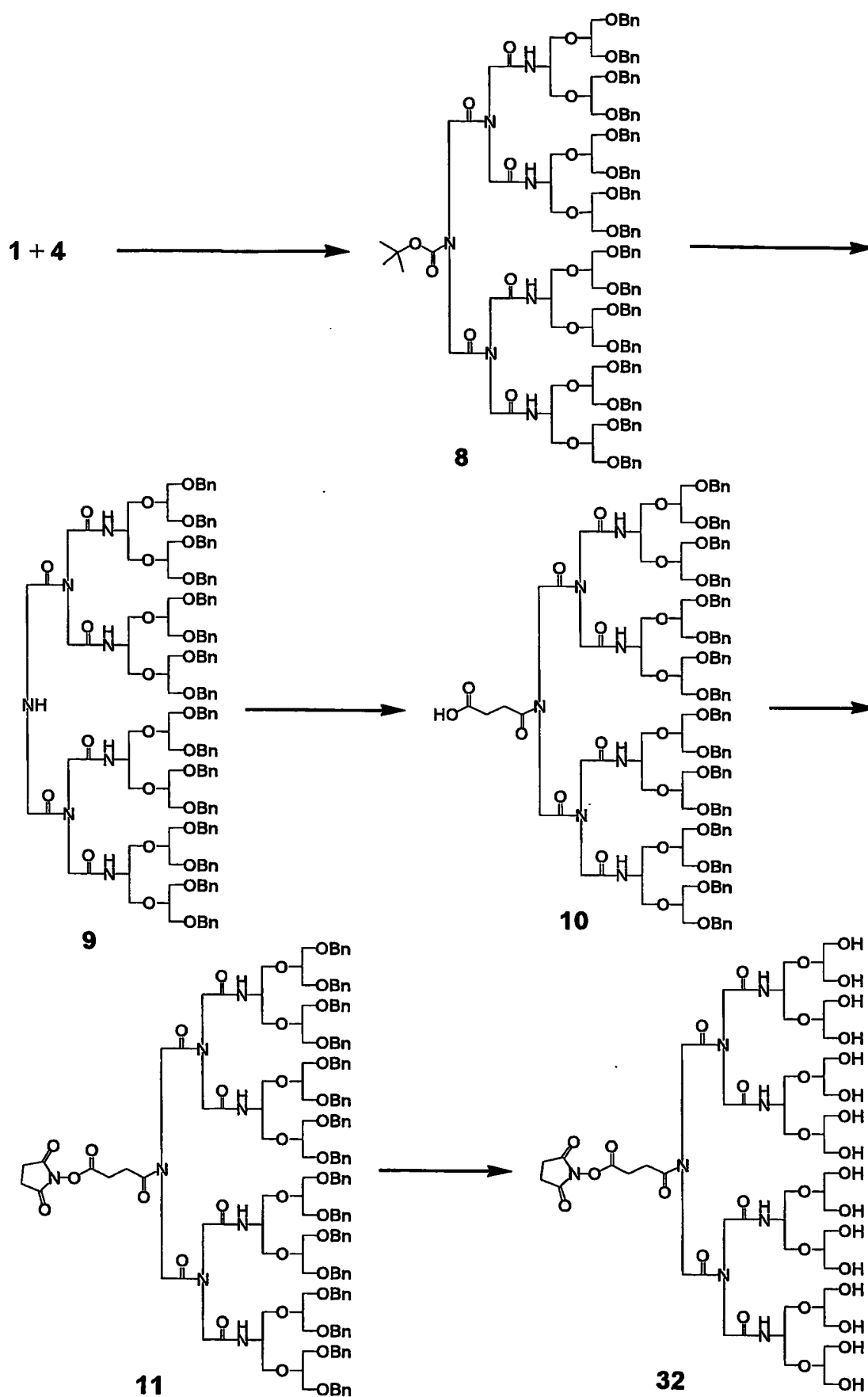
結果：約 19 分に溶出

<MALDI TOF-MS 分析>

結果：質量 20880 (3 分子結合体)、21540 (4 分子結合体) を主に検出

実施例 3 化合物の合成 [式 (3) で表される化合物]

反応スキームを以下に示す。反応スキーム中で、Bn はベンジル基を表す。



化合物 4 (624mg, 0.48mmol) の DMF 溶液 (13mL) に化合物 1 (51mg, 0.219mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (0.15mL, 0.876mmol) および PyBOP (228mg, 0.428mmol) を室温に加え、同温度で 48 時間攪拌した。反応混合物を 5%硫酸水素カリウム水溶液中に注いだ後、酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。その後有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、これを濾過した後、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : 酢酸 = 100 : 0.7) で精製し、黄色油状の化合物 8 (322mg, 0.115mmol, 収率 53%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 7.32–7.17 (80H, m), 4.49–4.38 (32H, m), 4.15–4.06 (4H, m), 3.77–3.27 (68H, m), 1.32 (9H, s), (CONH は明確に確認されず)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 170.2 ($\text{C} \times 4$, CONH), 167.7 ($\text{C} \times 2$, CON), 155.4 (C , O_2CN), 138.2 ($\text{C} \times 16$), 128.3 ($\text{CH} \times 16$), 128.3 ($\text{CH} \times 16$), 127.7 ($\text{CH} \times 16$), 127.6 ($\text{CH} \times 16$), 127.6 ($\text{CH} \times 16$), 80.5 (C), 78.7 ($\text{CH} \times 8$), 73.2 ($\text{CH}_2 \times 16$), 70.2 ($\text{CH}_2 \times 16$), 68.9 ($\text{CH}_2 \times 8$), 52.1 ($\text{CH}_2 \times 2$), 51.9 ($\text{CH}_2 \times 4$), 49.6 ($\text{CH} \times 4$), 28.2 ($\text{CH}_3 \times 3$)。

化合物 8 (322mg, 0.115mmol) のジクロロメタン溶液 (48.32mL) にトリフルオロ酢酸 (0.48mL) を室温で滴下した。同温度で 24 時間攪拌した後、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中に注ぎ、ジクロロメタンで抽出した後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、これを濾過した後、溶媒を減圧下で留去することにより白色油状の化合物 9 (310mg, 0.115mmol, 収率 100%) を得た。本品は精製することなく次の反応に付した。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 7.33–7.18 (80H, m), 4.50–4.39 (32H, m), 4.20–4.02 (4H, m), 3.94–3.28 (68H, m), (NH は明確に確認されず), (CONH は明確に確認されず)。

化合物 9 (190mg, 0.071mmol) のピリジン溶液 (3mL) に無水コハク酸 (28mg, 0.28mmol)、および *N,N*-ジメチルアミノピリジン (4mg, 0.036mmol) を室温に加え、50°C で 5 時間攪拌した。反応液を 2mol/L 塩酸水溶液に加えジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、これを濾過した後、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマト

グラフィー（酢酸エチル：酢酸＝100：0.7）で精製して、白色油状の化合物 1 0（150mg, 0.054mmol, 収率 76%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 7.35–7.17 (80H, m), 4.50–4.39 (32H, m), 4.22–4.05 (4H, m), 4.02–3.27 (68H, m), 2.62–2.53 (4H, m), (OH および CONH のいずれも明確に確認されず)。

化合物 1 0（150mg, 0.054mmol）のテトラヒドロフラン溶液（2mL）に NHS（12mg, 0.11mmol）を室温に加え、同温度で 15 分間攪拌した後、EDC（21mg, 0.11mmol）およびトリエチルアミン（7mL, 0.043mmol）を室温に加え、30 分間還流した。反応液を 5% KHSO_4 水溶液に加え、ジクロロメタンで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、これを濾過した後、溶媒を減圧下で留去した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン＝20：1）で精製し、油状の化合物 1 1（62mg, 0.21mmol, 収率 40%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 7.39–7.18 (80H, m), 4.54–4.38 (32H, m), 4.23–4.07 (4H, m), 4.89–3.33 (68H, m), 2.77–2.69 (4H, m), 2.57–2.49 (4H, m), (CONH は明確に確認されず)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 172.1 (C, CO_2^-), 170.4 (C, CON), 169.5 (C \times 4, CONH), 168.7 (C \times 2, CON), 168.1 (C \times 2, CON), 138.8 (C \times 16), 129.0 (CH \times 16), 129.0 (CH \times 16), 128.2 (CH \times 16), 128.0 (CH \times 16), 127.6 (CH \times 16), 79.3 (CH \times 8), 73.8 ($\text{CH}_2\times$ 16), 70.5 ($\text{CH}_2\times$ 16), 68.9 ($\text{CH}_2\times$ 8), 52.1 ($\text{CH}_2\times$ 2), 51.9 ($\text{CH}_2\times$ 4), 50.4 (CH \times 4), 30.3 (CH_2), 30.2 (CH_2), 25.9 ($\text{CH}_2\times$ 2)。

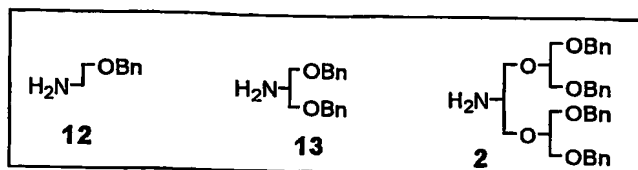
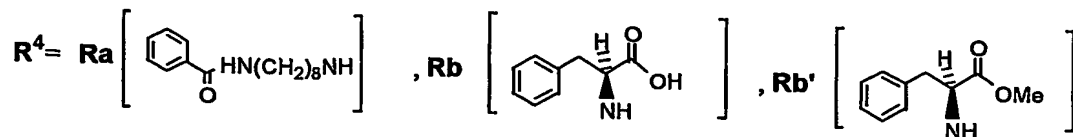
TOF-MS: 精密質量分析 (M) = 2886, 測定値 (M+1) = 2887.44

化合物 1 1（14mg, 4.85 μmol ）のエタノール溶液（1mL）に水素気流下、室温で $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (Pd: 20 重量%含有, 1mg) を加えた後、同温度で 3 時間攪拌した。反応液を、セライト 535 を用いて濾過した後、溶媒を減圧下で留去し、化合物 3 2（6mg, 4.15 μmol , 収率 86%）を得た。

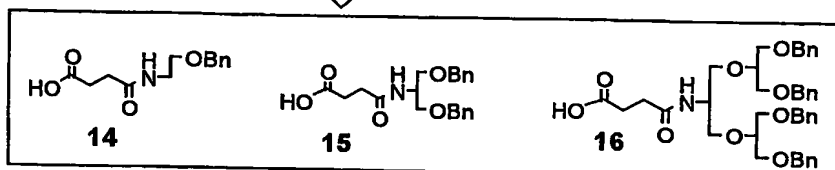
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 4.27–4.07 (4H, m), 3.85–3.36 (72H, m), 2.66–2.41 (8H, m)

実施例 4 本発明化合物で修飾された化学修飾低分子化合物の合成 (化合物 2 4 a ~ 2 8 a)

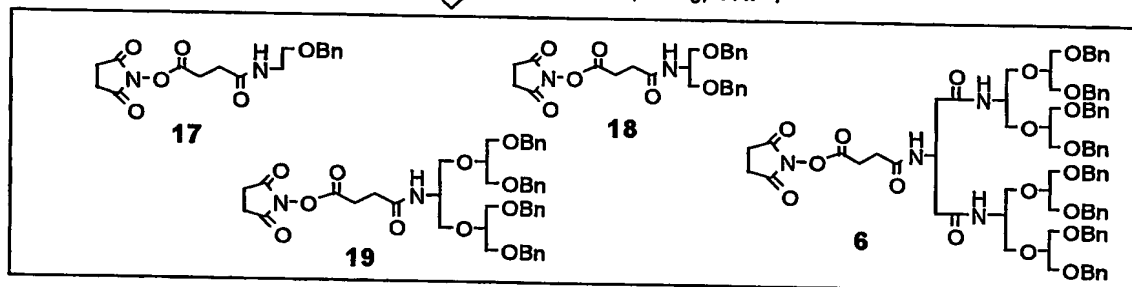
反応スキームを以下に示す。反応スキーム中で、Et はエチル基、Bn はベンジル基、NHS は N-ヒドロキシスクシンイミド、EDC は 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、THF はテトラヒドロフランを表す。



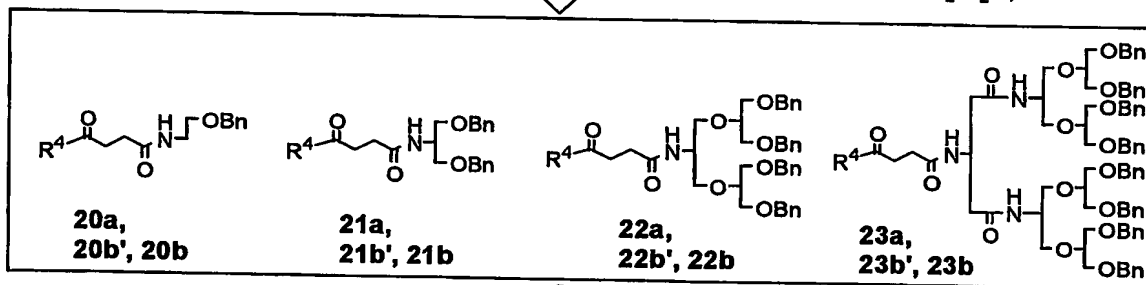
↓ 無水コハク酸、ピリジン



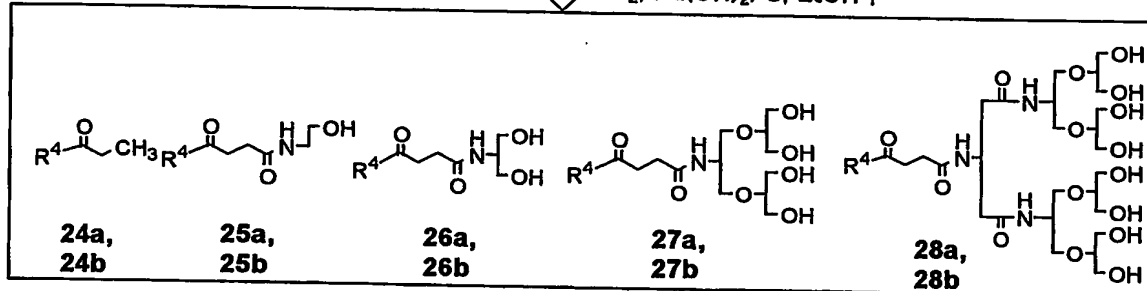
↓ NHS, EDC, NEt₃, THF中



↓ R⁴-H, NEt₃, THF または CH₂Cl₂ 中



↓ H₂, Pd(OH)₂/C, EtOH中



化合物 1 2 は、シンセティック・コミュニケーションズ (Synth. Commun.), 25, 907 (1995 年) に記載の方法、化合物 1 3 と化合物 2 は、ジャーナル・オ

ブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.), 38, 1673 (1995 年) に記載の方法で合成した。

化合物 1 2、1 3 および 2 (1.0mmol) それぞれのピリジン溶液 (2.0mL) に室温で、無水コハク酸 (150.1mg, 1.5mmol) をゆっくりと加えた後、100℃で 1.5～4 時間攪拌した。反応液を室温まで冷やした後、2mol/L 塩酸を加え、ジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=1：3) で精製し、それぞれ化合物 1 4～1 6 を得た (収率 92～100%)。

(化合物 1 4)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.51 (2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 2.69 (2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 3.49 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.59 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 4.54 (2H, s), 6.20 (1H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 7.31–7.42 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 175.8 (C), 172.5 (C), 137.4 (C), 128.1 ($\text{CH}\times 2$), 127.5 ($\text{CH}\times 2$), 127.5 (CH), 72.6 (CH_2), 68.2 (CH_2), 39.1 (CH_2), 30.2 (CH_2), 29.2 (CH_2).

(化合物 1 5)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.49 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.57 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.54 (2H, dd, $J=7.2, 4.9\text{Hz}$), 3.64 (2H, dd, $J=7.2, 3.0\text{Hz}$), 4.25–4.32 (1H, m), 4.50 (4H, s), 6.09 (1H, d, $J=6.9\text{Hz}$), 7.25–7.37 (10H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 175.8 (C), 171.6 (C), 137.7 ($\text{C}\times 2$), 128.3 ($\text{CH}\times 4$), 127.6 ($\text{CH}\times 4$), 127.6 ($\text{CH}\times 2$), 127.6 (C), 73.1 ($\text{CH}_2\times 2$), 68.3 ($\text{CH}_2\times 2$), 48.7 (CH), 30.6 (CH_2), 29.6 (CH_2).

(化合物 1 6)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.06 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.44 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.50–3.82 (14H, m), 4.09–4.16 (1H, m), 4.50 (2H, s), 4.50 (2H, s), 6.82 (1H, d, $J=6.5\text{Hz}$), 7.25–7.36 (20H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ (ppm): 175.3 (C), 172.0 (C), 137.9 ($\text{C}\times 2$), 137.7 ($\text{C}\times 2$), 128.2 ($\text{CH}\times 4$), 128.2 ($\text{CH}\times 4$), 127.7 ($\text{CH}\times 4$), 127.6 ($\text{CH}\times 4$),

127.5 (CH \times 2), 127.4 (CH \times 2), 78.9 (CH \times 2), 73.4 (CH $_2$ \times 2), 73.2 (CH $_2$ \times 2), 70.5 (CH $_2$ \times 2), 69.9 (CH $_2$ \times 2), 68.4 (CH $_2$ \times 2), 49.6 (CH), 30.1 (CH $_2$), 30.0 (CH $_2$).

化合物 1 4 ~ 1 6 (1.0mmol) それぞれのテトラヒドフラン溶液 (45mL) に、室温で NHS (126.6mg, 1.1mmol)、EDC (412.7mg, 2.0mmol) およびトリエチルアミン (0.11mL, 0.8mmol) を順次加えた後、2~4 時間還流した。反応液に 5%硫酸水素カリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=1：10) で精製し、それぞれ化合物 1 7 ~ 1 9 を得た (収率 53~90%)。

(化合物 1 7)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.61 (2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 2.87 (4H, s), 3.19 (2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 3.49 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.59 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 4.55 (2H, s), 6.13-6.25 (1H, m), 7.31-7.42 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 170.1 (C \times 2), 169.1 (C), 168.2 (C), 137.8 (C), 128.5 (CH \times 2), 127.9 (CH \times 2), 127.9 (CH), 73.2 (CH $_2$), 68.9 (CH $_2$), 39.5 (CH $_2$), 30.6 (CH $_2$), 26.8 (CH $_2$), 25.5 (CH $_2$ \times 2).

(化合物 1 8)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.59 (2H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 2.79 (4H, s), 2.98 (2H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 3.54 (2H, dd, $J=7.5, 5.0\text{Hz}$), 3.64 (2H, dd, $J=7.5, 3.0\text{Hz}$), 4.27-4.34 (1H, m), 4.51 (4H, s), 5.95 (1H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 7.25-7.39 (10H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 169.3 (C), 168.7 (C \times 2), 167.9 (C), 137.9 (C \times 2), 128.2 (CH \times 4), 127.6 (CH \times 4), 127.5 (CH \times 2), 73.1 (CH $_2$ \times 2), 68.3 (CH $_2$ \times 2), 48.6 (CH), 30.7 (CH $_2$), 26.7 (CH $_2$), 25.5 (CH $_2$ \times 2).

(化合物 1 9)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.12 (2H, t, $J=5.8\text{Hz}$), 2.77-2.82 (6H, m), 3.51-3.82 (14H, m), 4.09-4.17 (1H, m), 4.50 (2H, s), 4.51 (2H, s), 6.68 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$), 7.27-7.35 (20H, m).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 169.2 (C), 68.7 ($\text{C}\times 2$), 167.8 (C), 138.0 ($\text{C}\times 2$), 137.8 ($\text{C}\times 2$), 128.3 ($\text{CH}\times 4$), 128.2 ($\text{CH}\times 4$), 127.7 ($\text{CH}\times 4$), 127.6 ($\text{CH}\times 4$), 127.4 ($\text{CH}\times 4$), 79.0 ($\text{CH}\times 2$), 73.4 ($\text{CH}_2\times 2$), 73.3 ($\text{CH}_2\times 2$), 70.6 ($\text{CH}_2\times 2$), 70.0 ($\text{CH}_2\times 2$), 68.5 ($\text{CH}_2\times 2$), 49.4 (CH), 29.8 (CH_2), 26.5 (CH_2), 25.0 ($\text{CH}_2\times 2$).

N-(8-アミノオクチル)ベンズアミド塩酸塩 [N-(8-aminooctyl)benzamide hydrochloride (化合物 Ra-H \cdot HCl)] はシンセシス (Synthesis), 917 (1988 年) に記載の方法で合成した。

化合物 17～19 および 6 (1.0mmol) それぞれのテトラヒドロフラン溶液 (20mL) に、室温で化合物 Ra-H \cdot HCl (284.8mg, 1.0mmol)、およびトリエチルアミン (0.14mL, 1.0mmol) を順次加えた後、同温度で 3～6 時間攪拌した。反応液に 5%硫酸水素カリウム水溶液を加えた後、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 :メタノール=20:1) で精製し、それぞれ化合物 20a～23a を得た (収率 62～79%)。

(化合物 20a)

^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 1.23–1.68 (12H, m), 2.46–2.65 (4H, m), 3.18–3.60 (8H, m), 4.51 (2H, s), 6.13–6.38 (3H, m), 7.30–7.86 (10H, m).

^{13}C -NMR (CDCl_3 : CD_3OD =10:1, 75MHz) δ (ppm): 172.9 (C), 172.7 (C), 168.1 (C), 137.8 (C), 134.7 (C), 131.5 (CH), 128.6 ($\text{CH}\times 2$), 128.5 ($\text{CH}\times 2$), 127.9 ($\text{CH}\times 2$), 127.9 ($\text{CH}\times 2$), 126.9 (CH), 73.2 (CH_2), 68.7 (CH_2), 40.0 (CH_2), 39.5 (CH_2), 39.4 (CH_2), 31.8 (CH_2), 31.7 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 29.0 (CH_2), 26.8 (CH_2), 26.7 (CH_2).

(化合物 21a)

^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 1.23–1.68 (12H, m), 2.46–2.65 (4H, m), 3.20 (2H, q, $J=5.0\text{Hz}$), 3.45 (2H, q, $J=5.0\text{Hz}$), 3.52–3.66 (2H, dd, $J=8.0$, 4.5Hz), 3.63 (2H, dd, $J=8.0$, 3.0Hz), 4.23–4.31 (1H, m), 4.51 (4H, s), 5.94–6.19 (3H, m), 7.28–7.79 (15H, m).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 172.1 (C), 172.0 (C), 167.6 (C), 137.8 (C \times 2), 134.6 (C), 131.2 (CH), 128.4 (CH \times 2), 128.3 (CH \times 6), 127.6 (CH \times 2), 127.5 (CH \times 2), 126.7 (CH \times 2), 73.1 ($\text{CH}_2\times$ 2), 68.4 ($\text{CH}_2\times$ 2), 48.6 (CH), 40.0 (CH_2), 39.5 (CH_2), 31.9 (CH_2), 31.8 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.0 (CH_2), 29.0 (CH_2), 26.8 (CH_2), 26.6 (CH_2).

(化合物 2 2 a)

^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 1.23-1.68 (12H, m), 2.17 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.34 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.15 (2H, q, $J=5.0\text{Hz}$), 3.42 (2H, q, $J=5.0\text{Hz}$), 3.52-3.65 (10H, m), 3.65-3.84 (4H, m), 4.07-4.15 (1H, m), 4.45 (4H, s), 4.50 (4H, s), 6.30-6.45 (2H, m), 6.73 (1H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 7.28-7.79 (25H, m).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 172.1 (C), 172.0 (C), 167.5 (C), 138.1 (C \times 2), 138.0 (C \times 2), 134.8 (C), 131.6 (CH), 128.4 (CH \times 2), 128.4 (CH \times 4), 128.3 (CH \times 4), 127.7 (CH \times 4), 127.7 (CH \times 2), 127.6 (CH \times 2), 127.6 (CH \times 4), 126.9 (CH \times 2), 79.0 (CH \times 2), 73.4 ($\text{CH}_2\times$ 2), 73.3 ($\text{CH}_2\times$ 2), 70.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.0 (CH_2), 70.0 (CH_2), 68.5 ($\text{CH}_2\times$ 2), 49.4 (CH), 40.0 (CH_2), 39.4 (CH_2), 31.7 (CH_2), 31.4 (CH_2), 29.5 (CH), 29.4 (CH_2), 29.1 (CH_2), 29.0 (CH_2), 26.8 (CH_2), 26.7 (CH_2).

(化合物 2 3 a)

^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 1.23-1.68 (12H, m), 2.30 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.45 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.10 (2H, q, $J=5.0\text{Hz}$), 3.40 (2H, q, $J=5.0\text{Hz}$), 3.40-3.80 (32H, m), 4.10-4.22 (2H, m), 4.50 (16H, s), 5.87 (1H, brd, $J=5.0\text{Hz}$), 6.32 (1H, brd, $J=5.0\text{Hz}$), 7.08 (1H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 7.21-7.41 (40H, m), 7.41-7.55 (3H, m), 7.77 (2H, d, $J=5.5\text{Hz}$), 8.29 (1H, d, $J=6.0\text{Hz}$).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 173.1 (C), 171.7 (C), 168.5 (C), 168.0 (C), 167.3 (C), 138.1 (C \times 2), 138.0 (C \times 4), 137.9 (C \times 2), 134.7 (C), 131.1 (CH), 128.3, 128.2, 128.2, 127.6, 127.6, 127.5, 127.5, 127.5, 127.4, 127.4, および 126.7 (CH \times 44), 78.9 ($\text{CH}\times$ 2), 78.8 (CH \times 2), 73.3 ($\text{CH}_2\times$ 2), 73.3 ($\text{CH}_2\times$ 2), 73.2 ($\text{CH}_2\times$ 4), 70.3 ($\text{CH}_2\times$ 2), 70.2 ($\text{CH}_2\times$ 2), 69.9

(CH₂×2), 69.9 (CH₂×2), 68.8 (CH₂×2), 68.3 (CH₂×2), 53.4 (CH₂), 52.3 (CH₂), 49.9 (CH), 49.6 (CH), 40.0 (CH₂), 39.4 (CH₂), 31.1 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.2 (CH₂), 26.8 (CH₂), 26.7 (CH₂).

化合物 20a~23a (1.0mmol) それぞれのエタノール溶液 (15mL) に水素気流下、室温で、触媒量の Pd(OH)₂/C (Pd: 20 重量%含有) を加えた後、同温度で 3~6 時間攪拌した。反応液を、セライト 535 (和光純薬社製) を用いて濾過した後、溶媒を減圧下で留去し、それぞれ化合物 25a~28a を得た (収率 100%)。

(化合物 25a)

¹H-NMR (CD₃OD, 400MHz) δ (ppm): 1.28-1.41 (8H, m), 1.45-1.52 (2H, m), 1.58-1.66 (2H, m), 2.46-2.50 (4H, m), 3.16 (2H, t, J=5.5Hz), 3.30 (2H, t, J=4.5Hz), 3.38 (2H, t, J=5.5Hz), 3.58 (2H, t, J=4.5Hz), 7.41-7.53 (3H, m), 7.77-7.81 (2H, m).

¹³C-NMR (CDCl₃:CD₃OD=1:10, 75MHz) δ (ppm): 174.7 (C), 174.3 (C), 170.1 (C), 135.6 (C), 132.3 (CH), 129.3 (CH×2), 128.0 (CH×2), 61.4 (CH₂), 42.8 (CH₂), 40.9 (CH₂), 40.3 (CH₂), 32.2 (CH₂), 32.1 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.2 (CH₂×2), 27.8 (CH₂), 27.7 (CH₂).

(化合物 26a)

¹H-NMR (CD₃OD, 400MHz) δ (ppm): 1.28-1.41 (8H, m), 1.45-1.52 (2H, m), 1.58-1.66 (2H, m), 2.46-2.52 (4H, m), 3.16 (2H, t, J=5.5Hz), 3.38 (2H, t, J=5.5Hz), 3.55-3.65 (4H, m), 3.90 (1H, q, J=4.0Hz), 7.41-7.53 (3H, m), 7.77-7.81 (2H, m).

¹³C-NMR (CDCl₃:CD₃OD=3:7, 75MHz) δ (ppm): 173.9 (C), 173.4 (C), 169.2 (C), 134.9 (C), 131.8 (CH), 128.8 (CH×2), 127.4 (CH×2), 61.6 (CH₂×2), 53.3 (CH), 40.4 (CH₂), 39.8 (CH₂), 31.9 (CH₂), 31.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.5 (CH₂×3), 27.2 (CH₂), 27.1 (CH₂).

(化合物 27a)

¹H-NMR (CD₃OD, 400MHz) δ (ppm): 1.28-1.41 (8H, m), 1.45-1.52 (2H, m), 1.58-1.66 (2H, m), 2.46-2.52 (4H, m), 3.16 (2H, t, J=5.0Hz), 3.35 (2H, t,

J=5.0Hz), 3.55-3.80 (14H, m), 4.07-4.15 (1H, m), 7.41-7.53 (3H, m), 7.77-7.81 (2H, m).

^{13}C -NMR (CD_3OD , 75MHz) δ (ppm): 174.5 (C), 174.3 (C), 169.9 (C), 135.7 (C), 132.4 (CH), 129.4 ($\text{CH}\times 2$), 128.1 ($\text{CH}\times 2$), 82.9 ($\text{CH}\times 2$), 69.5 ($\text{CH}_2\times 2$), 62.4 ($\text{CH}_2\times 2$), 62.3 ($\text{CH}_2\times 2$), 51.0 (CH), 40.9 (CH_2), 40.5 (CH_2), 32.3 (CH_2), 32.2 (CH_2), 30.4 ($\text{CH}_2\times 2$), 30.2 ($\text{CH}_2\times 2$), 27.9 (CH_2), 27.8 (CH_2).

(化合物 2 8 a)

^1H -NMR (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 1.28-1.41 (8H, m), 1.45-1.52 (2H, m), 1.58-1.66 (2H, m), 2.48 (2H, t, J=5.0Hz), 2.60 (2H, t, J=5.0Hz), 3.16 (2H, t, J=5.5Hz), 3.38 (2H, t, J=5.5Hz), 3.52-3.82 (28H, m), 4.05 (2H, s), 4.15 (1H, t, J=4.0Hz), 4.22 (1H, t, J=4.0Hz), 4.27 (2H, s), 7.41-7.53 (3H, m), 7.77-7.81 (2H, m).

^{13}C -NMR (CD_3OD , 75MHz) δ (ppm): 175.6 (C), 174.2 (C), 171.7 (C), 171.4 (C), 170.0 (C), 135.7 (C), 132.4 (CH), 129.4 ($\text{CH}\times 2$), 128.1 ($\text{CH}\times 2$), 83.1 ($\text{CH}\times 2$), 82.9 ($\text{CH}\times 2$), 69.7 ($\text{CH}_2\times 2$), 69.5 ($\text{CH}_2\times 2$), 62.6 ($\text{CH}_2\times 2$), 62.5 ($\text{CH}_2\times 2$), 62.4 ($\text{CH}_2\times 4$), 54.5 (CH_2), 54.0 (CH_2), 51.6 (CH), 51.3 (CH), 41.0 (CH_2), 40.5 (CH_2), 31.7 (CH_2), 30.5 (CH_2), 30.3 ($\text{CH}_2\times 2$), 30.3 (CH_2), 29.2 (CH_2), 28.0 (CH_2), 27.9 (CH_2).

化合物 2 4 a [N-(8-プロピオニルアミノオクチル)ベンズアミド (N-(8-propionylaminooctyl)benzamide)] は $\text{Ra-H}\cdot\text{HCl}$ とプロピオン酸の NHS エステルを用い、上記と同様に反応させて取得した。

^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 1.15 (3H, t, J=6.0Hz), 1.29-1.68 (12H, m), 2.19 (2H, q, J=5.0Hz), 3.22 (2H, q, J=5.0Hz), 3.44 (2H, q, J=5.0Hz), 5.71 (1H, brd, CONH), 6.38 (1H, brd, CONH), 7.40-7.50 (3H, m), 7.77 (2H, d, J=6.0Hz).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 174.0 (C), 167.6 (C), 134.8 (C), 131.3 (CH), 128.5 ($\text{CH}\times 2$), 126.9 ($\text{CH}\times 2$), 40.0 (CH_2), 39.5 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.0 (CH_2), 29.0 (CH_2), 26.8 (CH_2), 26.7 (CH_2), 10.0 (CH_3).

実施例 5 化合物の合成 (化合物 2 4 b ~ 2 8 b)

化合物 1 7 ~ 1 9 および 6 (1.0mmol) それぞれのジクロロメタン溶液 (20mL) に、室温で L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩 (化合物 Rb' -H·HCl、431.4mg, 2.0mmol)、およびトリエチルアミン (0.42mL, 3.0mmol) を順次加えた後、同温度で 3~6 時間攪拌した。反応液に 5%硫酸水素カリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル=1 : 3) で精製し、それぞれ化合物 2 0 b' ~ 2 3 b' を得た (収率 79~97%)。

(化合物 2 0 b')

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.40 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.49 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.98 (1H, dd, $J=11.0, 5.0\text{Hz}$), 3.09 (1H, dd, $J=11.0, 5.0\text{Hz}$), 3.40 (2H, t, $J=4.0\text{Hz}$), 3.48 (2H, t, $J=4.0\text{Hz}$), 3.60 (3H, s), 4.45 (2H, s), 4.79 (1H, brq, $J=5.0\text{Hz}$), 6.83 (1H, t, $J=4.0\text{Hz}$), 7.10-7.32 (10H, m), (二つの-NH は明確に観察されず)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 171.0 (C), 170.9 (C), 170.9 (C), 136.8 (C), 135.1 (C), 128.0 ($\text{CH}\times 2$), 127.3 ($\text{CH}\times 2$), 127.2 ($\text{CH}\times 2$), 126.5 ($\text{CH}\times 2$), 125.7 ($\text{CH}\times 2$), 71.8 (CH_2), 67.7 (CH_2), 52.4 (CH_3), 51.0 (CH), 38.3 (CH_2), 36.7 (CH_2), 30.2 ($\text{CH}_2\times 2$)。

(化合物 2 1 b')

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.42-2.52 (4H, m), 3.05 (1H, dd, $J=11.0, 5.0\text{Hz}$), 3.12 (1H, dd, $J=11.0, 4.8\text{Hz}$), 3.52 (2H, dd, $J=7.5, 4.5\text{Hz}$), 3.63 (2H, dd, $J=7.5, 3.0\text{Hz}$), 3.70 (3H, s), 4.25-4.32 (1H, m), 4.50 (4H, s), 4.83 (1H, dt, $J=6.0, 5.0\text{Hz}$), 6.06 (1H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 6.33 (1H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 7.08-7.35 (15H, m)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 172.0 (C), 171.7 (C), 171.7 (C), 138.0 ($\text{C}\times 2$), 136.0 (C), 129.2, 128.5, 128.4, 127.6 および 127.0 ($\text{CH}\times 15$),

73.1 ($\text{CH}_2 \times 2$), 68.4 ($\text{CH}_2 \times 2$), 53.3 (CH_3), 52.2 (CH), 48.6 (CH), 37.8 (CH_2), 31.4 (CH_2), 31.3 (CH_2).

(化合物 2 2 b')

^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.13 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.34 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.03 (1H, dd, $J=11.0$, 4.8Hz), 3.11 (1H, dd, $J=11.0$, 4.8Hz), 3.49–3.80 (14H, m), 3.67 (3H, s), 4.12 (1H, q, $J=5.5\text{Hz}$), 4.49 (4H, s), 4.50 (4H, s), 4.80 (1H, dt, $J=5.0$, 6.0Hz), 6.59–6.64 (2H, m), 7.09–7.33 (25H, m).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm): 171.9 (C), 171.7 (C), 171.6 (C), 138.1 ($\text{C} \times 2$), 138.0 ($\text{C} \times 2$), 136.0 (C), 129.2, 128.5, 128.4, 128.3, 127.7, 127.7, 127.6 および 127.0 ($\text{CH} \times 25$), 79.0 (CH), 79.0 (CH), 73.4 ($\text{CH}_2 \times 2$), 73.3 ($\text{CH}_2 \times 2$), 70.4 (CH_2), 70.0 (CH_2), 68.5 ($\text{CH}_2 \times 2$), 68.5 ($\text{CH}_2 \times 2$), 53.3 (CH_3), 52.1 (CH), 49.4 (CH), 37.8 (CH_2), 31.3 (CH_2), 30.9 (CH_2).

(化合物 2 3 b')

^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.26–2.45 (4H, m), 3.00 (1H, dd, $J=11.0$, 5.0Hz), 3.06 (1H, dd, $J=11.0$, 5.0Hz), 3.34–3.80 (32H, m), 3.63 (3H, s), 4.07–4.14 (1H, m), 4.17–4.25 (1H, m), 4.46 (16H, s), 4.77 (1H, dt, $J=6.0$, 5.0Hz), 6.15 (1H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 6.97 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$), 7.06–7.52 (45H, m), 8.36 (1H, d, $J=6.0\text{Hz}$).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm): 173.0 (C), 171.8 (C), 171.5 (C), 168.8 (C), 168.3 (C), 138.3 ($\text{C} \times 2$), 138.2 ($\text{C} \times 2$), 138.2 ($\text{C} \times 2$), 138.1 ($\text{C} \times 2$), 136.0 (C), 129.3, 128.5, 128.4, 128.4, 127.8, 127.7, 127.6 および 127.0 ($\text{CH} \times 45$), 79.0 ($\text{CH} \times 2$), 78.6 ($\text{CH} \times 2$), 73.4 ($\text{CH}_2 \times 2$), 73.3 ($\text{CH}_2 \times 2$), 73.3 ($\text{CH}_2 \times 4$), 70.4 ($\text{CH}_2 \times 2$), 70.2 ($\text{CH}_2 \times 2$), 70.0 ($\text{CH}_2 \times 2$), 70.0 ($\text{CH}_2 \times 2$), 68.9 ($\text{CH}_2 \times 2$), 68.4 ($\text{CH}_2 \times 2$), 53.6 (CH_2), 53.2 (CH_3), 52.3 (CH_2), 52.1 (CH), 49.9 (CH), 49.6 (CH), 37.8 (CH_2), 30.7 (CH_2), 27.8 (CH_2).

化合物 2 0 b' ~ 2 3 b' (1.0mmol) のそれぞれを 10%水酸化カリウムエタノール溶液 (15mL) 中、室温で 6~12 時間攪拌した。反応液に 5%硫酸水素カリウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、

無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、それぞれ化合物 20b~23b を得た (収率 91~99%)。

(化合物 20b)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.43-2.49 (4H, m), 3.02 (1H, dd, $J=11.0$, 5.0Hz), 3.16 (1H, dd, $J=11.0$, 4.0Hz), 3.43 (2H, brt, $J=3.5$ Hz), 3.53 (2H, t, $J=3.5$ Hz), 4.50 (2H, s), 4.74 (1H, brdd, $J=5.0$, 4.0Hz), 6.64 (1H, brd, CONH), 6.84 (1H, brd, $J=3.5$ Hz, CONH), 7.14-7.40 (10H, m), 8.45 (1H, brd, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 173.2 (C), 173.0 (C), 72.3 (C), 137.5 (C), 136.1 (C), 129.3 (CH), 128.3 (CH $\times 2$), 128.2 (CH $\times 2$), 127.7 (CH $\times 2$), 127.7 (CH $\times 2$), 126.6 (CH), 73.0 (CH $_2$), 68.4 (CH $_2$), 53.6 (CH), 39.5 (CH $_2$), 37.3 (CH $_2$), 31.8 (CH $_2\times 2$).

(化合物 21b)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.40-2.46 (4H, m), 3.05 (1H, dd, $J=11.0$, 4.5Hz), 3.19 (1H, dd, $J=11.0$, 4.0Hz), 3.51 (2H, dd, $J=7.0$, 4.5Hz), 3.61 (2H, dd, $J=7.0$, 4.5Hz), 4.20-4.28 (1H, m), 4.49 (4H, s), 4.72 (1H, ddd, $J=6.0$, 4.0, 4.5Hz), 6.29 (1H, d, $J=6.0$ Hz, CONH), 6.68 (1H, d, $J=6.0$ Hz, CONH), 7.12-7.36 (15H, m), (COOH は明確に確認されず).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 173.5 (C), 172.9 (C), 172.3 (C), 137.8 (C $\times 2$), 136.2 (C), 129.5, 129.5, 128.4, 128.4, 127.8, 127.8, 127.7 および 126.9 (CH $\times 15$), 73.2 (CH $_2\times 2$), 68.3 (CH $_2\times 2$), 53.5 (CH), 48.9 (CH), 37.3 (CH $_2$), 32.1 (CH $_2$), 32.0 (CH $_2$).

(化合物 22b)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 2.14-2.41 (4H, m), 3.03 (1H, dd, $J=11.0$, 5.5Hz), 3.18 (1H, dd, $J=11.0$, 4.5Hz), 3.47-3.76 (14H, m), 4.07-4.13 (1H, m), 4.48-4.52 (8H, m), 4.67 (1H, brdd, $J=5.5$, 4.5Hz), 6.76-6.86 (2H, m), 7.13-7.34 (25H, m), (COOH は明確に確認されず).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 173.3 (C), 172.7 (C), 172.2 (C), 138.0 (C), 138.0 (C), 137.9 (C), 137.8 (C), 136.4 (C), 129.5, 128.4, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.7, 127.6 および 126.9

(CH \times 25), 79.0 (CH), 78.9 (CH), 73.4 (CH $_2$ \times 2), 73.4 (CH $_2$ \times 2), 70.3 (CH $_2$), 70.0 (CH $_2$), 68.4 (CH $_2$ \times 4), 53.6 (CH), 49.7 (CH), 37.2 (CH $_2$), 31.9 (CH $_2$), 31.7 (CH $_2$).

(化合物 2 3 b)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl $_3$, 400MHz) δ (ppm): 2.22–2.58 (4H, m), 2.92 (1H, dd, $J=9.0$, 5.0Hz), 3.11 (1H, dd, $J=9.0$, 3.5Hz), 3.29–3.80 (32H, m), 4.07–4.14 (1H, m), 4.16–4.23 (1H, m), 4.46 (16H, s), 4.64 (1H, ddd, $J=6.0$, 5.0, 3.5Hz), 6.38 (1H, d, $J=6.0$ Hz), 7.00 (1H, d, $J=6.0$ Hz), 6.91–7.47 (45H, m), 8.10 (1H, d, $J=6.0$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl $_3$, 75MHz) δ (ppm): 173.5 (C), 172.8 (C), 172.6 (C), 166.9 (C), 168.4 (C), 138.2 (C), 138.2 (C), 138.1 (C), 138.1 (C), 138.1 (C), 138.0 (C), 138.0 (C), 137.9 (C), 136.4 (C), 129.3, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7 および 126.9 (CH \times 45H), 78.9 (CH), 78.9 (CH), 78.7 (CH), 78.6 (CH), 73.4 (CH $_2$ \times 2), 73.4 (CH $_2$ \times 2), 73.3 (CH $_2$ \times 4), 70.4 (CH $_2$), 70.4 (CH $_2$), 70.4 (CH $_2$), 70.3 (CH $_2$), 70.2 (CH $_2$), 70.2 (CH $_2$), 70.1 (CH $_2$), 70.0 (CH $_2$), 68.8 (CH $_2$ \times 2), 68.4 (CH $_2$ \times 2), 53.6 (CH), 53.3 (CH $_2$), 52.1 (CH $_2$), 50.0 (CH), 49.7 (CH), 37.1 (CH $_2$), 31.1 (CH $_2$), 28.4 (CH $_2$).

化合物 2 0 b～2 3 b (1.0mmol) それぞれのエタノール溶液 (15mL) に水素気流下、室温で、触媒量の Pd/(OH) $_2$ (Pd : 20 重量%含有, 10～50mg) を加えた後、同温度で 6～12 時間攪拌した。反応液を、セライト 535 を用いて濾過した後、溶媒を減圧下で留去し、それぞれ化合物 2 5 b～2 8 b を得た (収率 89～97%)。

(化合物 2 5 b)

$^1\text{H-NMR}$ (CD $_3$ OD, 400MHz) δ (ppm): 2.36–2.50 (4H, m), 2.95 (1H, dd, $J=14.0$, 9.0Hz), 3.18 (1H, dd, $J=14.0$, 5.0Hz), 3.30 (2H, t, $J=6.0$ Hz), 3.56 (2H, t, $J=6.0$ Hz), 4.64 (1H, dd, $J=9.0$, 5.0Hz), 7.16–7.30 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD $_3$ OD, 75MHz) δ (ppm): 174.9 (C), 174.7 (C), 174.5 (C), 138.4 (C), 130.3 (CH \times 2), 129.4 (CH \times 2), 127.8 (CH), 61.6 (CH $_2$), 55.1 (CH), 43.0 (CH $_2$), 38.4 (CH $_2$), 32.2 (CH $_2$), 32.0 (CH $_2$).

(化合物 2 6 b)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 2.52–2.59 (4H, m), 3.00–3.21 (2H, m), 3.62–3.75 (4H, m), 4.00–4.04 (1H, m), 4.60–4.66 (1H, m), 7.35–7.49 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75MHz) δ (ppm): 174.8 (C), 174.7 (C), 174.7 (C), 138.3 (C), 130.2 ($\text{CH}\times 2$), 129.4 ($\text{CH}\times 2$), 127.7 (CH), 62.0 ($\text{CH}_2\times 2$), 55.1 (CH), 54.4 (CH), 38.4 (CH_2), 32.3 (CH_2), 32.0 (CH_2).

(化合物 2 7 b)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 2.53–2.63 (4H, m), 3.11 (1H, dd, $J=11.0$, 7.0Hz), 3.32 (1H, dd, $J=11.0$, 4.0Hz), 3.62–3.81 (14H, m), 4.21 (1H, q, $J=4.0\text{Hz}$), 4.71–4.75 (1H, m), 7.36–7.49 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75MHz) δ (ppm): 174.5 (C), 174.3 (C), 173.3 (C), 138.1 (C), 130.1 (CH), 130.1 (CH), 129.3 (CH), 129.3 (CH), 127.7 (CH), 82.7 ($\text{CH}\times 2$), 69.4 ($\text{CH}_2\times 2$), 62.3 ($\text{CH}_2\times 2$), 62.2 ($\text{CH}_2\times 2$), 54.9 (CH), 50.8 (CH), 38.2 (CH_2), 32.0 (CH_2), 31.8 (CH_2).

(化合物 2 8 b)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 2.49–2.52 (4H, m), 2.93 (1H, dd, $J=11.0$, 6.0Hz), 3.19 (1H, dd, $J=11.0$, 4.0Hz), 3.30–3.79 (28H, m), 4.00–4.03 (2H, m), 4.13–4.18 (2H, m), 4.18–4.23 (2H, m), 4.45–4.51 (1H, m), 7.19–7.29 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}=20:1$, 75MHz) δ (ppm): 176.4 (C), 175.1 (C), 172.2 (C), 172.1 (C), 171.7 (C), 137.8 (C), 130.2 ($\text{CH}\times 2$), 129.6 ($\text{CH}\times 2$), 127.9 (CH), 82.0 ($\text{CH}\times 4$), 69.3 ($\text{CH}_2\times 4$), 61.6 ($\text{CH}_2\times 4$), 61.5 ($\text{CH}_2\times 4$), 55.5 (CH), 53.9 (CH_2), 53.4 (CH_2), 51.0 (CH), 50.7 (CH), 37.9 (CH_2), 31.1 (CH_2), 28.7 (CH_2).

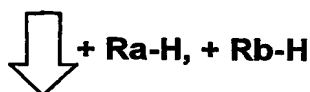
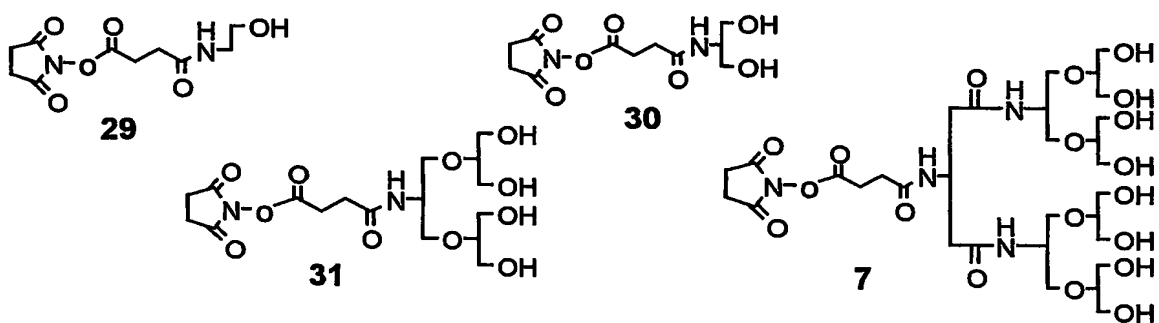
化合物 2 4 b [(3-フェニル-(S)-2-プロピオニル)アミノプロピオン酸 ((3-phenyl-(S)-2-propionyl)aminopropionic acid)] は L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩 ($\text{Rb-H}\cdot\text{HCl}$) とプロピオン酸の NHS エステルを用い、上記と同様にして取得した。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 1.02 (3H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 2.16 (2H, q, $J=6.0\text{Hz}$), 3.13 (1H, dd, $J=11.0, 5.0\text{Hz}$), 3.24 (1H, dd, $J=11.0, 5.0\text{Hz}$), 4.66 (1H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 7.17-7.28 (5H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75MHz) δ (ppm): 174.6 (C), 174.4 (C), 135.8 (C), 129.4 (CH), 128.6 (CH), 127.2 (CH), 53.2 (CH), 37.3 (CH_2), 29.5 (CH_2), 9.7 (CH_3).

実施例 6 本発明化合物で修飾された化学修飾低分子化合物の合成 [化合物 25a ~ 28a の合成の別法]

反応スキームを以下に示す。



25a - 28a
25b - 28b

化合物 17 ~ 19 (1.0mmol) それぞれのエタノール溶液 (15mL) に水素気流下、室温で、触媒量の $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (Pd : 20 重量%含有, 10~50mg) を加えた後、同温度で 6~12 時間攪拌した。反応液を、セライト 535 を用いて濾過した後、溶媒を減圧下で留去し、それぞれ化合物 29 ~ 31 を得た (収率 62~100%)。

(化合物 29)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 2.71 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.97 (4H, s), 3.22 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.49 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.59 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$).

(化合物 30)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 2.72 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.89 (4H, s), 3.01 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.66 (4H, d, $J=4.5\text{Hz}$), 3.90-3.98 (1H, m).

(化合物 3 1)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 2.69 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 2.89 (4H, s), 3.01 (2H, t, $J=5.0\text{Hz}$), 3.60-3.82 (14H, m), 4.14-4.21 (1H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3O , 300MHz) δ (ppm): 172.8 (C), 171.5 (C $\times 2$), 169.6 (C), 83.0 (CH $\times 2$), 69.6 (CH $_2\times 2$), 62.5 (CH $_2\times 2$), 62.3 (CH $_2\times 2$), 51.2 (CH), 31.0 (CH $_2$), 27.5 (CH $_2$), 26.5 (CH $_2\times 2$).

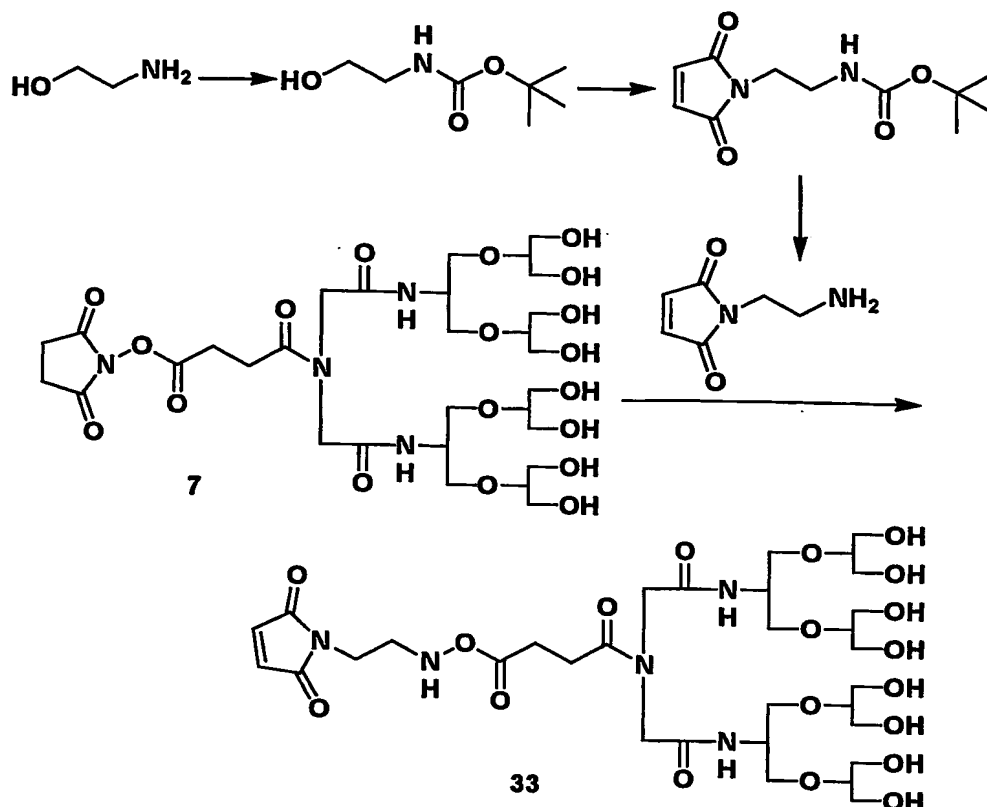
化合物 Ra-H (1.0mmol, 285mg) と化合物 2 9 ~ 3 1 および 7 (2.0mmol) それぞれを 5%りん酸二カリウム塩水溶液中 (5mL)、室温で 1 時間攪拌し、それぞれ化合物 2 5 a ~ 2 8 a を得た (実施例 4 での合成品と照合し、それぞれ同一化合物であることが確認された)。

実施例 7 本発明化合物で修飾された化学修飾低分子化合物の合成 (化合物 2 5 b ~ 2 8 b の合成の別法)

L-フェニルアラニン (Rb-H, 1.0mmol, 165mg) と化合物 2 9 ~ 3 1 および 7 (2.0mmol) それぞれを 5%りん酸二カリウム塩水溶液中 (5mL)、室温で 1 時間攪拌し、それぞれ化合物 2 5 b ~ 2 8 b を得た (実施例 5 での合成品と照合し、それぞれ同一化合物であることが確認された)。

実施例 8 化合物の合成 [式 (4) で表される化合物]

反応スキームを以下に示す。



エタノールアミン (500mg, 8.2mmol) および水酸化ナトリウム (1.7g, 40mmol) をジオキサンと水の混合溶媒 (10 : 1, 50mL) に懸濁し、得られた懸濁液にジ-tert-ブチルジカーボナート (1.96g, 9.0mmol) を 0℃で数回に分けて加えた。反応液を 0℃で 2 時間攪拌した後、硫酸水素カリウム水溶液 (5%, 50mL) を加え、酢酸エチル (150mL) を用いて抽出した。抽出した有機層を水 (30mL)、飽和食塩水 (30mL) で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、粗精製の (2-ヒドロキシエチル)カルバミン酸 tert-ブチルエステル [(2-hydroxyethyl)carbamic acid tert-butyl ester ; 1.32g, 8.2 mmol, 収率 100%] を得た。

トリフェニルホスフィン (2.15g, 8.2mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (25mL) に光延試薬 [ジエチルアゾジカルボキシレート (diethyl azodicarboxylate)] のトルエン溶液 (1.106g/mL, 8.2mmol, 1.29mL) を -78℃でゆっくりと加えた。得られた溶液に (2-ヒドロキシエチル)カルバミン酸 tert-ブチルエステル (1.32g, 8.2mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (5mL) およびマレイミド (794 mg, 8.2 mmol) を加え、-78℃で 5 分間攪拌した後、室温で

36 時間攪拌した。得られた反応液を濃縮した後、エーテルを加え、生じた沈殿を濾過して取り除いた。得られた濾液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1）で精製し、2-（マレイミド）エチルカルバミン酸 tert-ブチルエステル [2-(maleimido)ethylcarbamic acid tert-butyl ester ; 531mg, 2.53mmol, 収率 31%] を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz) δ (ppm): 6.72 (2H, s), 4.75 (1H, br, NH), 3.66 (2H, t, J=5.6Hz), 3.33 (2H, dt, J=5.1, 5.6 Hz), 1.40 (9H, s).

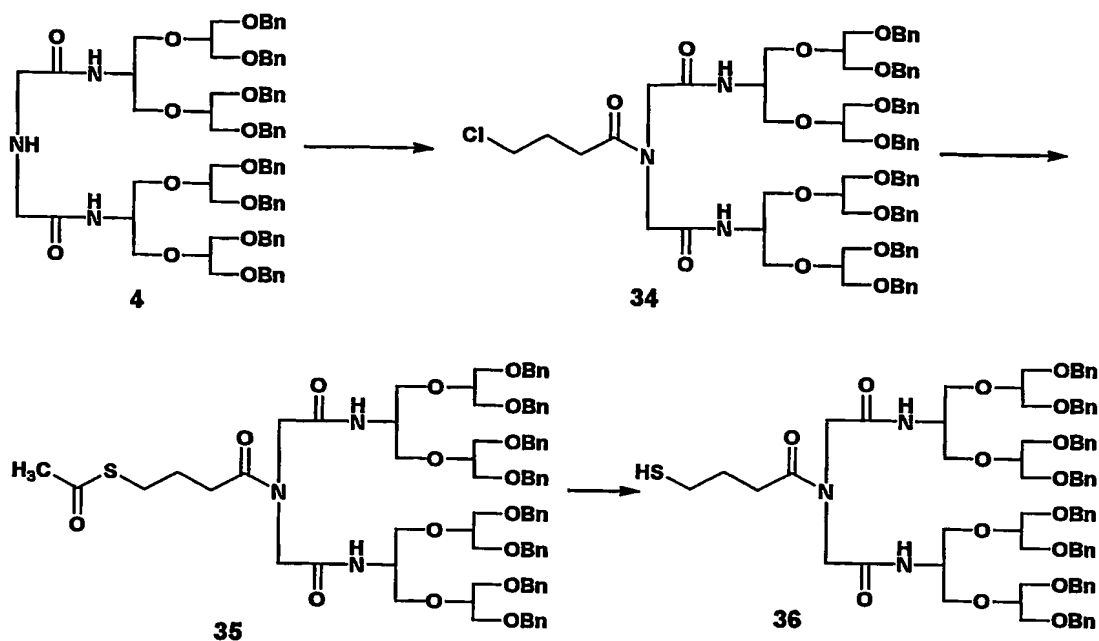
(2-マレイミド)カルバミン酸 tert-ブチルエステル (48mg, 0.2mmol) をトリフルオロ酢酸とジクロロメタンの混合溶媒 (30 : 70, 5mL) に溶解し、0℃で2時間攪拌した後、反応液を濃縮した。得られた残渣をジクロロメタン (20mL) に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10mL) を加え、分液した。有機層を炭酸水素カリウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、1-(2-アミノエチル)-3-ピロリン-2,5-ジオン [1-(2-aminoethyl)-3-pyrroline-2,5-dione ; 28mg, 0.2mmol, 収率 100%] を得た。

化合物 7 (77.2mg, 0.1mmol) および 1-(2-アミノエチル)-3-ピロリン-2,5-ジオン (28.0mg, 0.2mmol) を水 (5mL) に懸濁し、室温で2時間攪拌した。反応液を濃縮し、得られた残渣を分取用逆相薄層クロマトグラフィー（分取用逆相 TLC）（水：メタノール＝10：1）で精製し、化合物 33 (39mg, 0.05mmol, 収率 50%) を得た。

¹H-NMR (CD₃OD, 300MHz) δ (ppm): 6.56 (2H, s), 4.22-4.05 (6H, m), 3.80-3.43 (32H, m), 2.96-2.74 (4H, m).

実施例 9 化合物の合成 [式 (5) で表される化合物]

反応スキームを以下に示す。反応スキーム中で、Bn はベンジル基を表す。



化合物 3 4 をジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー (J. Org. Chem.) , 50, 1148-1156 (1990 年) に記載の方法に従って調製した。化合物 4 (300mg, 0.231mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (3mL) を 0℃に冷却し、60%水素化ナトリウム (10.2mg, 0.255mmol) を加えた後、10 分間攪拌した。反応液に 4-クロロ酪酸クロライド (0.028ml, 0.255mmol) を加え 10 分間攪拌した後、室温にて 8 時間攪拌した。反応液に 1mol/L 塩酸を加えた後、酢酸エチルを用いて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=1 : 2) で精製し、化合物 3 4 (231.6 mg, 0.165 mmol, 収率 71%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 8.38 (1H, d, $J=8\text{Hz}$, CONH), 7.33-7.21 (40H, m), 6.99 (1H, d, $J=7.2\text{Hz}$, CONH), 4.46 (16H, s), 4.25-4.06 (2H, m), 3.80-3.37 (34H, m), 2.29 (2H, t, $J=6.8\text{Hz}$), 1.97 (2H, quint, $J=6.4\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm): 172.4 (C), 168.5 (C), 167.9 (C), 138.0 ($\text{C}\times 2$), 138.0 ($\text{C}\times 2$), 137.9 ($\text{C}\times 2$), 137.9 ($\text{C}\times 2$), 128.1, 128.1, 128.1, 127.6, 127.4, 127.3 および 127.3 ($\text{CH}\times 40$), 78.9 ($\text{CH}\times 2$), 78.5 ($\text{CH}\times 2$), 73.3 ($\text{CH}_2\times 2$), 73.2 ($\text{CH}_2\times 2$), 73.1 ($\text{CH}_2\times 4$), 70.4 ($\text{CH}_2\times 2$), 70.1 ($\text{CH}_2\times 2$),

69.9 ($\text{CH}_2 \times 2$), 69.8 ($\text{CH}_2 \times 2$), 68.8 ($\text{CH}_2 \times 2$), 68.2 ($\text{CH}_2 \times 2$), 53.5 (CH_2), 52.2 (CH_2), 49.8 (CH), 49.5 (CH), 44.4 (CH_2), 29.2 (CH_2), 27.4 (CH_2).

化合物 3 5 をジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 111, 285-291 (1989 年) に記載の方法に従って調製した。

化合物 3 4 (231.6mg, 0.165mmol) のエタノール溶液 (50mL) に、室温でチオ酢酸 (0.024mL, 0.331mmol) およびナトリウムエトキシド (22.5mg, 0.331mmol) を加えた後、15 時間還流した。反応液を室温まで冷却した後、1mol/L 塩酸を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。有機層を 5%炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製し、化合物 3 5 (174.9mg, 0.121mmol, 収率 73%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 8.48 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, CONH), 7.33-7.20 (40H, m), 6.96 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$), 4.46 (16H, s), 4.26-4.05 (2H, m), 3.80-3.35 (32H, m), 2.80 (2H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 2.26 (3H, s), 2.19 (2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 1.80 (2H, quint, $J=7.0\text{Hz}$).

化合物 3 6 をジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 85, 1337-1341 (1963 年) に記載の方法に従って調製した。

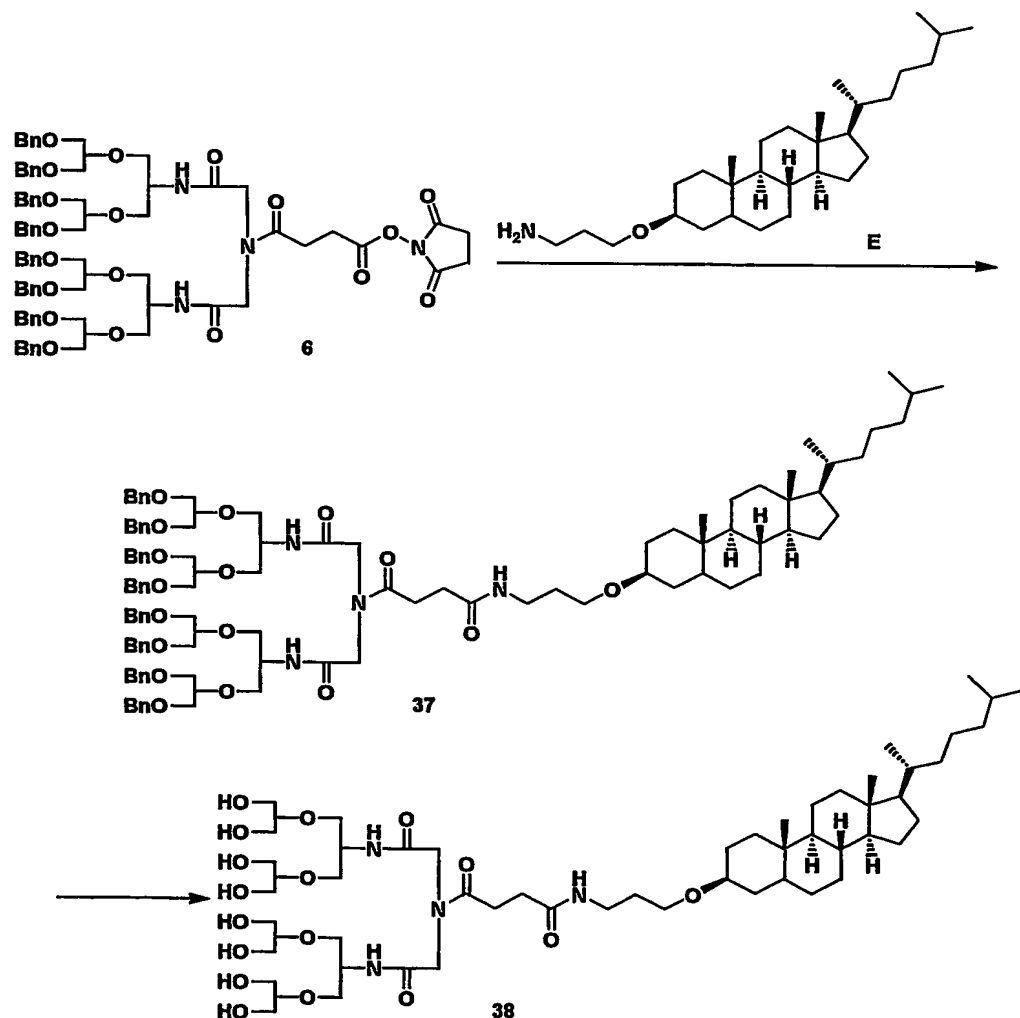
化合物 3 5 (174.9mg, 0.121mmol) のエタノール溶液 (10mL) に、 0°C で 0.6mol/L 水酸化ナトリウムエタノール溶液 (5mL, 3mmol) を加え、室温で 24 時間攪拌した。反応液に 1mol/L 塩酸を加えた後、酢酸エチルを用いて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製し、化合物 3 6 (113.3mg, 0.079mmol, 収率 67%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 8.53 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$), 7.35-7.18 (40H, m), 6.98 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$), 4.45 (16H, s), 4.27-4.05 (2H, m), 3.81-3.32 (32H, m), 2.55 (2H, t, $J=6.8\text{Hz}$), 2.23 (2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 1.90 (2H, quint, $J=6.8\text{Hz}$).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100MHz) δ (ppm): 172.7 (C), 168.6 (C), 168.1 (C), 138.1 (C \times 2), 138.0 (C \times 2), 137.9 (C \times 2), 137.9 (C \times 2), 128.1, 128.1, 127.6, 127.4, 127.3 および 127.3 (CH \times 40), 78.8 (CH \times 2), 78.5 (CH \times 2), 73.3 (CH $_2$ \times 2), 73.1 (CH $_2$ \times 2), 73.1 (CH $_2$ \times 4), 70.3 (CH $_2$ \times 2), 70.1 (CH $_2$ \times 2), 69.9 (CH $_2$ \times 2), 69.8 (CH $_2$ \times 2), 68.8 (CH $_2$ \times 2), 68.2 (CH $_2$ \times 2), 53.6 (CH $_2$), 52.2 (CH $_2$), 49.8 (CH), 49.4 (CH), 37.3 (CH $_2$), 30.5 (CH $_2$), 23.7 (CH $_2$).

実施例 10 本発明化合物で修飾された化学修飾ステロール類の調製

反応スキームを以下に示す。反応スキーム中で、Bn はベンジル基を表す。



化合物 6 (2.4g, 1.61mmol) のテトラヒドロフラン溶液に、室温で化合物 E (1.43g, 3.22mmol) およびジメチルアミノピリジン (DMAP ; 0.79g, 6.44mmol)

を順次加えた後、同温度で 2 時間攪拌した。反応液を 5%硫酸水素カリウム水溶液に注いだ後、酢酸エチルを用いて抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール=20：1）で精製し、化合物 3 7 (2.45 g, 1.33 mmol, 収率 83%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 8.28–8.22 (1H, m, CONH), 8.35–8.19 (m, 40H), 7.10–7.00 (1H, m, CONH), 6.17–6.09 (1H, m, CONH), 4.51–4.43 (16H, m), 3.80–3.40 (36H, m), 3.26–3.20 (2H, m), 3.19–3.08 (1H, m), 2.48–2.41 (2H, m), 2.35–2.29 (2H, m), 2.00–0.80 (33H, m), 0.90 (3H, d, $J=6.4\text{Hz}$), 0.86 (6H, d, $J=6.4\text{Hz}$), 0.77 (3H, s), 0.63 (3H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 173.1 (C), 171.5 (C), 168.1 (C), 138.2 (C), 128.3, 127.6 および 127.5 ($\text{CH}\times 40$), 78.9 ($\text{CH}\times 4$) 70.4 ($\text{CH}_2\times 8$), 70.0 ($\text{CH}_2\times 8$), 68.4 ($\text{CH}_2\times 4$), 66.4 (CH_2), 56.5 (CH), 56.3 (CH), 54.4 (CH), 52.3 ($\text{CH}_2\times 2$), 44.8 ($\text{CH}\times 2$), 42.6 (C), 40.0 (CH_2), 39.5 (CH_2), 38.0 (CH_2), 37.0 (CH_2), 36.2 (CH_2), 35.8 (CH), 35.8 (C), 35.5 (CH), 34.8 (CH_2), 32.1 (CH_2), 31.1 (CH_2), 31.0 (CH_2), 29.6 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.0 (CH), 24.3 (CH_2), 23.9 (CH_2), 22.9 (CH_3), 22.6 (CH_3), 21.3 (CH_2), 18.7 (CH_3), 12.4 (CH_3), 12.1 (CH_3).

化合物 3 7 (2.45g, 1.33mmol) のエタノール溶液 (15mL) に、水素気流下、室温で $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (Pd: 20 重量%含有, 260mg) を加えた後、同温度で 3 時間攪拌した。反応液をセライト 535 を用いて濾過した後、溶媒を減圧下で留去し、化合物 3 8 (1.52g, 1.33mmol, 収率 100%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) δ (ppm): 4.33–4.12 (4H, m), 4.08–3.99 (2H, m), 3.93–3.36 (32H, m), 3.27–3.17 (1H, m), 2.66–2.43 (4H, m), 2.07–0.85 (33H, m), 0.93 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 0.88 (6H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 0.82 (3H, s), 0.69 (3H, s).

参考例 1 G-CSF 誘導体の調製

ヒト G-CSF (hG-CSF) の 1 番目のスレオニンをアラニンに、3 番目のロイシンをスレオニンに、4 番目のグリシンをチロシンに、5 番目のプロリンをアルギニンに、17 番目のシステインをセリンにそれぞれ置換した配列番号 1 または配列番号 2 に示したアミノ酸配列を有する hG-CSF 誘導体を、特公平 07-096558 に記載の方法により取得した。なお、配列番号 1 は、Met を N 末端にシグナルペプチドのアミノ酸として含んでいる。

前記の hG-CSF 誘導体をコードする DNA を含むプラスミド pCfBD28 を保有する大腸菌 W3110strA 株 (*Escherichia coli* ECfBD28 FERM BP-1479) を LG 培地 (バクトトリプトン 10g、酵母エキス 5g、塩化ナトリウム 5g、グルコース 1g を水 1L に溶かし、NaOH で pH を 7.0 とする) で 37℃、18 時間培養し、この培養液 5mL を 25 μ g/mL のトリプトファンと 50 μ g/mL のアンピシリンを含む MCG 培地 (Na_2HPO_4 0.6%、 KH_2PO_4 0.3%、塩化ナトリウム 0.5%、カザミノ酸 0.5%、 MgSO_4 1mmol/L、ビタミン B14 μ g/mL、pH 7.2) 100mL に摂取し、30℃で 4~8 時間培養した後、トリプトファンの誘導物質である 3 β -インドールアクリル酸 (3 β -indoleacrylic acid) を 10 μ g/mL 加え、さらに 2~12 時間培養を続けた。培養液を 8,000rpm、10 分間遠心して集菌し、30mmol/L 塩化ナトリウム、30mmol/L トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した。

洗浄菌体を前記緩衝液 30mL に懸濁し、0℃で 10 分間超音波破碎 (BRANSON SONIC POWER COMPANY 社製、SONIFIER CELL DISRUPTOR 200、OUTPUT CONTROL 2) した。該超音波破碎物を 9,000rpm で 30 分間遠心分離して菌体残渣を得た。

菌体残渣からマーストンらの方法 [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 2, 800 (1984 年)] に準じ、hG-CSF 誘導体を抽出・精製・可溶化・再生した。

参考例 2 ポリエチレングリコール修飾 G-CSF 誘導体の調製

50mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.6) で 4.0mg/mL に調製した参考例 1 の G-CSF 誘導体 995mL に 19.1g (蛋白質 1 モル当たり 4.5 モル) の活性化 PEG 誘導体 (M-SPA-20,000、Shearwater Polymers, Inc. 社製、平均分子量約 20,000) を添加し、4℃で一昼夜反応させた。次いで、20mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化した

SP Sepharose FF カラム 2000mL (Amersham-Pharmacia Biotech 社製) に通塔し精製した。

目的画分 4000mL を濃縮し、11.2mg/mL の目的物を含む溶液 320mL を得た (収率 90.4%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、4-20%グラジエントゲル (ATTO 社製 PAGEL SPG-520L) で SDS-PAGE を行い、1~3 分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過 HPLC 分析>

TSK gel G-4000SW_{XL} カラム (7.8×300mm×2 本連結, 東ソー社製) 2 本を用い、以下の方法で分析した。

保持時間 : 38.2 分 (1 分子結合体)

34.4 分 (2 分子結合体)

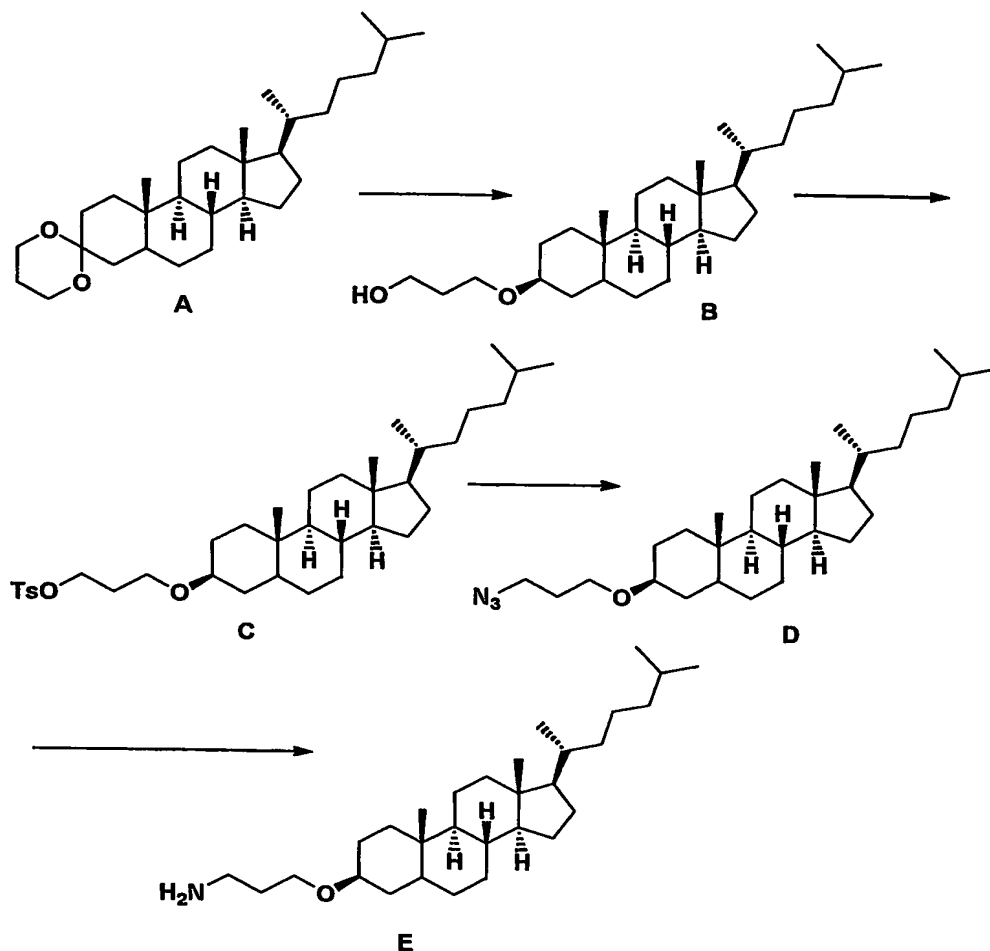
32.2 分 (3 分子結合体)

移動相 : 150mmol/L 塩化ナトリウム、20mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 流量 : 0.5mL/分

検出 : UV280nm

参考例 3 3-(3 β , 5 α -コレスタンオキシ)プロピル-1-アミン [化合物 E ; 3-(3 β , 5 α -cholestanoxy)propyl-1-amine] の合成

反応スキームを以下に示す。反応スキーム中で、Ts はトシル基を表す。



化合物Aは、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティ，パーキン・トランスアクション1 (J. Chem. Soc., Perkin Trans.1) , 1, 158-160 (1979 年) に記載の方法により合成した。

化合物Bをジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー (J. Org. Chem.) , 58, 6756-6765 (1993 年) に記載の方法に従って調製した。化合物A (556mg, 1.25mmol) のジクロロメタン溶液 (4mL) を -78°C に冷却し、 $\text{BH}_3 \cdot \text{S}(\text{CH}_3)_2$ (0.47mL, 5mmol) およびトリメチルシリルトリフラート (TMSOTf; 0.9mL, 5mmol) を加えた後、同温度で 15 分間攪拌した。反応液を炭酸水素ナトリウム水溶液中に注いだ後、ジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=3：1) で精製し、化合物B [3-(3 β , 5 α -cholestan-3-yl)propan-1-ol; 279mg, 0.63mmol, 収率 50%] を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 3.78 (2H, t, $J=6.4\text{Hz}$), 3.67 (2H, t, $J=6.4\text{Hz}$), 3.23 (1H, dddd, $J=6.4, 6.4, 14.4, 14.4\text{Hz}$), 2.67 (1H, brs, OH), 2.00–0.81 (33H, m), 0.90 (3H, d, $J=6.4\text{Hz}$), 0.86 (6H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 0.79 (3H, s), 0.64 (3H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 79.7 (CH), 68.3 (CH_2), 63.3 (CH_2), 57.1 (CH), 56.9 (CH), 55.0 (CH), 45.5 (CH), 43.2 (C), 40.7 (CH_2), 40.2 (CH_2), 37.6 (CH_2), 36.8 (CH_2), 36.4 (CH), 36.4 (C), 36.1 (CH), 35.4 (CH_2), 32.8 (CH_2), 32.8 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.7 (CH), 24.9 (CH_2), 24.5 (CH_2), 23.5 (CH_3), 23.2 (CH_3), 21.9 (CH_2), 19.3 (CH_3), 13.0 (CH_3), 12.7 (CH_3).

化合物B (5.17g, 11.58mmol) のジクロロメタン溶液 (50mL) に、室温でトルエンスルホニルクロライド (4.42g, 23.16mmol) およびトリエチルアミン (7.8mL, 46.32mmol) を加えた後、同温度で 24 時間攪拌した。反応液を 5%硫酸水素カリウム水溶液に注いだ後、ジクロロメタンを用いて抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、化合物C [3-(3 β , 5 α -cholestanoxyl)propyl 4-methylbenzenesulfonate ; 6.95g, 11.58mmol, 収率 100%] を得た。

化合物C (6.95g, 11.58mmol) の DMF 溶液 (40mL) に、アジ化ナトリウム (2.86g, 44 mmol) を室温で加えた後、120°Cで 3 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に注ぎ、ジエチルエーテルを用いて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下で留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) で精製し、化合物D [3-(3 β , 5 α -cholestanoxyl)propyl-1-azide ; 4.67 g, 9.91 mmol, 収率 86%] を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 3.52–3.43 (2H, m), 3.36–3.29 (2H, t, $J=6.8\text{Hz}$), 3.14 (1H, dddd, $J=4.4, 4.4, 10.8, 10.8\text{Hz}$), 2.00–0.75 (33H, m), 0.90 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 0.86 (6H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 0.72 (3H, s), 0.58 (3H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 78.8 (CH), 64.4 (CH_2), 56.5 (CH), 56.3 (CH), 54.4 (CH), 48.6 (CH_2), 44.8 (CH), 42.6 (C), 40.0 (CH_2), 39.5 (CH_2),

37.0 (CH₂), 36.2 (CH₂), 35.8 (CH), 35.8 (C), 35.5 (CH), 34.8 (CH₂), 32.1 (CH₂), 29.6 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.0 (CH), 24.2 (CH₂), 23.8 (CH₂), 22.8 (CH₃), 22.6 (CH₃), 21.2 (CH₃), 18.7 (CH₃), 12.3 (CH₃), 12.1 (CH₃).

化合物D (1.97g, 4.18mmol) のエタノール溶液 (25mL) に、水素気流下、室温で Pd(OH)₂/C (Pd: 20 重量%含有, 230mg) を加えた後、同温度で 12 時間攪拌した。反応液を、セライト 535 を用いて濾過した後、溶媒を減圧下で留去し、化合物 E [3-(3β, 5α-cholestanoxo)propyl-1-amine; 1.86g, 4.18mmol, 収率 100%] を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz) δ (ppm): 3.60-3.49 (2H, m), 3.20 (1H, dddd, J=4.4, 4.4, 10.4, 10.4Hz), 2.81 (2H, t, J=6.4Hz), 2.07-0.81 (33H, m), 0.90 (3H, d, J=6.0Hz), 0.86 (6H, d, J=5.6Hz), 0.79 (3H, s), 0.64 (3H, s).

産業上の利用可能性

本発明で開示された化合物は生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物の化学修飾に有用である。さらに該化合物で修飾された化学修飾ポリペプチド等は安定性または水溶性が向上しているだけでなく、従来の化学修飾ポリペプチド等に比較して著しく生理活性を維持した状態で製造し得る。本発明の化学修飾ポリペプチド等は、生体内に投与された際に長時間有効にその生理活性を示し、該生理活性に関連した症状の改善剤または治療剤として有用である。また、当該化合物で修飾された化学修飾低分子化合物は、安定性または水溶性が向上しており、低分子医薬品、低分子試薬の可溶化剤等として有用である。

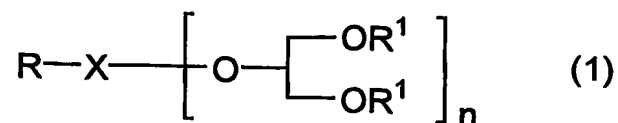
「配列フリーテキスト」

配列番号 1—人工配列の説明: hG-CSF の 5 アミノ酸置換ペプチド

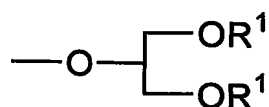
配列番号 2—人工配列の説明: hG-CSF の 5 アミノ酸置換ペプチド

請求の範囲

1. 式 (1)

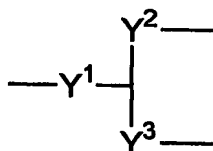


(式中、R は反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基を表し、n は 3 以上の整数を表し、X は n 個の

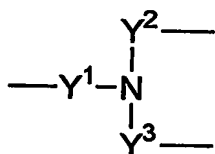


を有することが可能な残基を表し、R¹ は水素原子または水素原子に変換可能な基を表し、6 個以上存在する R¹ はそれぞれ同一でも異なってもよい) で表される化合物。

2. 全ての R¹ が水素原子である、請求の範囲 1 記載の化合物。
3. 全ての R¹ がベンジルである、請求の範囲 1 記載の化合物。
4. n が 2^m (式中、m は 2 以上の整数を表す) である、請求の範囲 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の化合物。
5. X が 1 以上の直列的分岐構造を有する、請求の範囲 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。
6. X が 1 個以上 (n-1) 個以下の

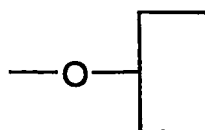


または



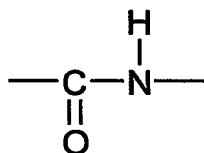
(式中、 Y^1 、 Y^2 および Y^3 はそれぞれ独立して、単結合、あるいは置換もしくは非置換のアルキレン、カルボニル、置換もしくは非置換のイミノ、O、S、スルホニルおよびスルフィニルからなる群より選ばれる一つまたは同一もしくは異なった複数の任意の組み合わせを表し、 Y^1 、 Y^2 および Y^3 が複数存在するとき、これらはそれぞれ同一でも異なってもよい) で表される構造を含有する、請求の範囲 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

7. X が 1 個以上 (n-1) 個以下の



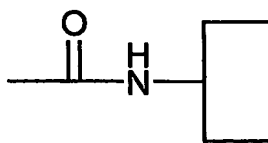
で表される構造を含有する、請求の範囲 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

8. X が 1 個以上 (n-1) 個以下の



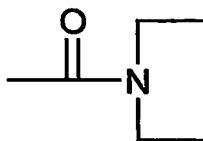
で表される構造を含有する、請求の範囲 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

9. X が 1 個以上 (n-1) 個以下の



で表される構造を含有する、請求の範囲 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

10. X が 1 個以上 (n-1) 個以下の



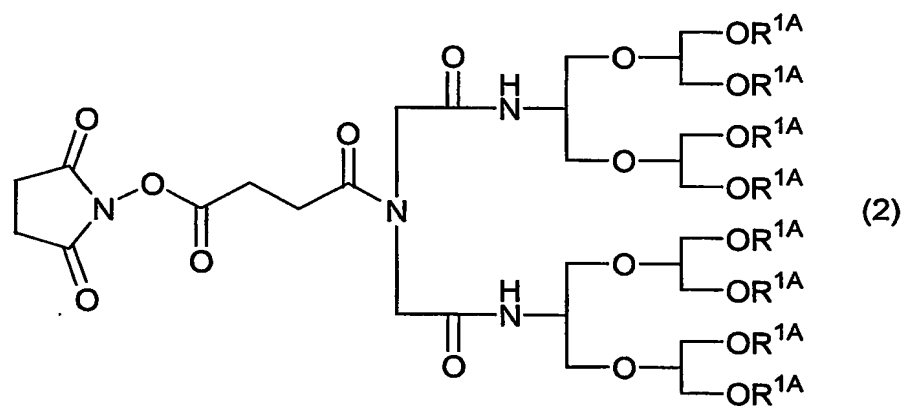
で表される構造を含有する、請求の範囲 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物。

11. 反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基が、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体中のアミノ酸側鎖、N 末端アミノ基もしくは C 末端カルボキシル基、またはポリペプチドと結合した糖鎖との反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基である請求の範囲 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の化合物。

12. 反応性を有する基または反応性を有する基に変換可能な基を含有する残基が、カルボン酸活性エステル残基、カーボネート、マレイミド、メルカプト、ホルミル、トレシル、イソシアナート、酸無水物残基、酸ハロゲン化物残基、ビニルスルホニル、ヒドラジド、アミノ、水酸基、ハロゲン、カルボキシ、ビニルおよびホスホノからなる群より選ばれる基である請求の範囲 1 ～ 11 のいずれかに記載の化合物。

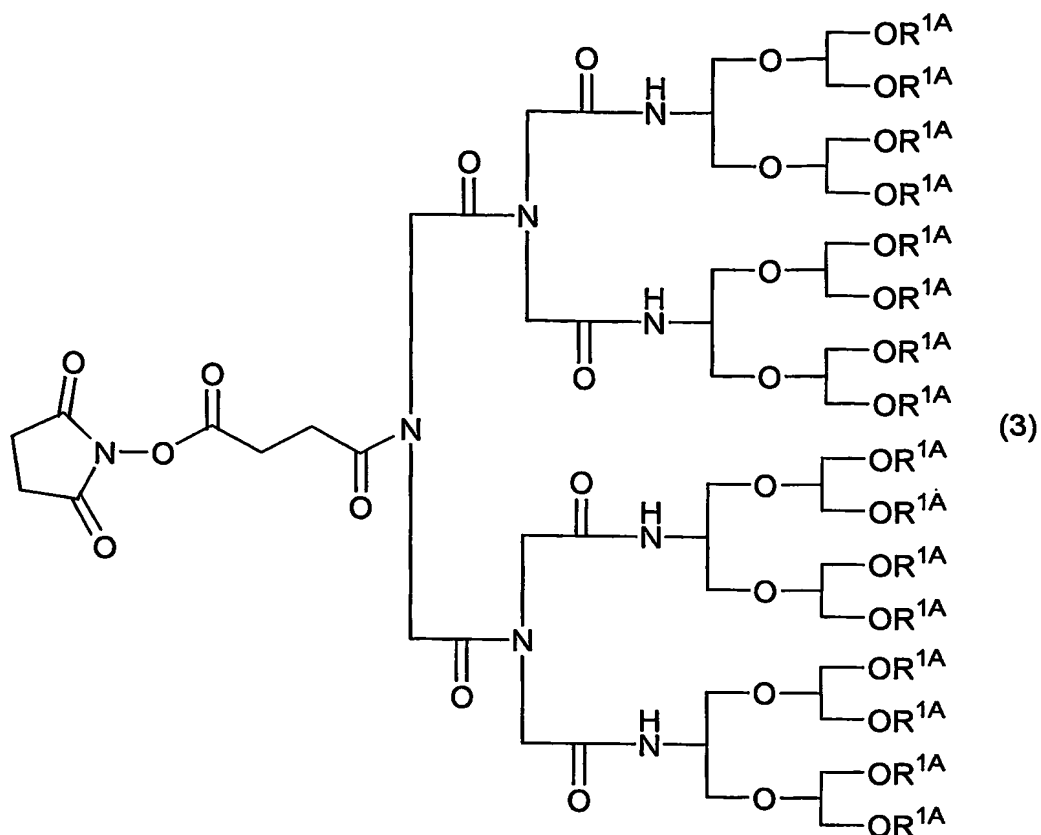
13. 請求の範囲 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の化合物を少なくとも二つ含有する混合物。

14. 式 (2)



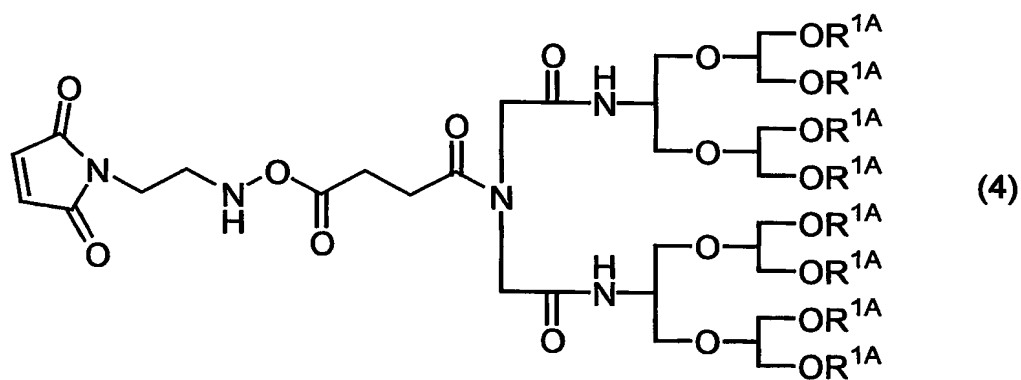
(式中、R^{1A} は水素原子またはベンジルを表す) で表される化合物。

15. 式 (3)



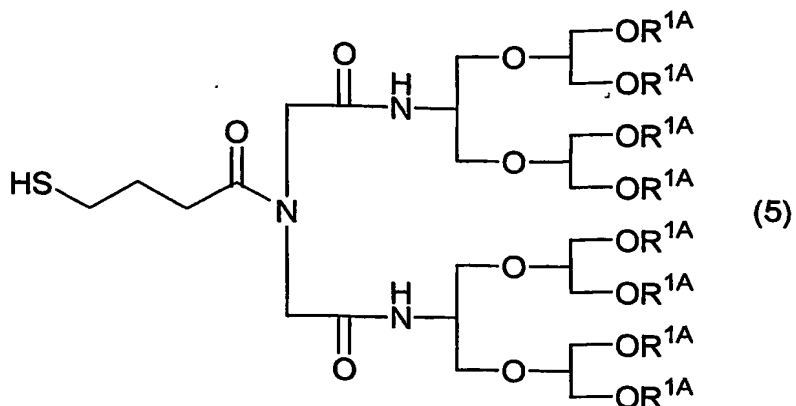
(式中、R^{1A}は水素原子またはベンジルを表す) で表される化合物。

16. 式 (4)



(式中、R^{1A}は水素原子またはベンジルを表す) で表される化合物。

17. 式 (5)



(式中、R^{1A}は水素原子またはベンジルを表す) で表される化合物。

18. 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が少なくとも 1 個の請求の範囲 1 ~ 12 および 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物で直接もしくはスペーサーを介して修飾された化学修飾ポリペプチド。

19. 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、酵素、サイトカイン、ホルモン、毒素、抗体およびそれらの誘導体からなる群より選ばれる請求の範囲 18 記載の化学修飾ポリペプチド。

20. 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、アスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide Dismutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine Deaminase)、インターロイキン-1~24 (Interleukin-1~24)、インターフェロン- α (Interferon- α)、インターフェロン- β (Interferon- β)、インターフェロン- γ (Interferon- γ)、インターフェロン- ω (Interferon- ω)、インターフェロン- τ (Interferon- τ)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、エリスロポエチン (Erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、クローソ (Klotho) 蛋白質、レプチン (Leptin)、繊維芽細胞増殖因子 1~19 (Fibroblast Growth Factor-1~19)、ミッドカイン (Midkine)、カルシトニン (Calcitonin)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、グルカゴン (Glucagon)、インスリン (Insulin)、インスリン様成長因

子 1 (Insulin-like Growth Factor-1)、オステオジェニックプロテイン 1 (Osteogenic Protein-1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Growth Factor)、アミリン (Amylin)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon-like Peptide)、成長ホルモン (Growth Hormone)、ナトリウム利尿ペプチド類 (Natriuretic Peptide)、プラスミノゲン (Plasminogen)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、エンドスタチン (Endostatin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Cell Growth Factor)、リシン (Ricin)、シュードモナス外毒素 (Pseudomonas Exotoxin)、ジフテリア毒素 (Diphtheria Toxin) およびそれらの溶解性レセプターならびにそれらの誘導体からなる群より選ばれる請求の範囲 18 記載の化学修飾ポリペプチド。

21. 生理活性ポリペプチドの誘導体が、該ポリペプチドのアミノ酸欠失体、アミノ酸置換体、アミノ酸挿入体、アミノ酸付加体、糖鎖欠失体および糖鎖付加体からなる群より選ばれる請求の範囲 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の化学修飾ポリペプチド。

22. 請求の範囲 18 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の化学修飾ポリペプチドを含有する医薬。

23. 請求の範囲 1 ~ 12 および 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物で生理活性ポリペプチドまたはその誘導体を化学修飾することを特徴とする、該生理活性ポリペプチドまたは該その誘導体の安定性または水溶性を向上させる方法。

24. 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、酵素、サイトカイン、ホルモン、毒素、抗体およびそれらの誘導体からなる群より選ばれる請求の範囲 23 記載の方法。

25. 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が、アスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide Dismutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ

(Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine Deaminase)、インターロイキン-1~24 (Interleukin-1~24)、インターフェロン- α (Interferon- α)、インターフェロン- β (Interferon- β)、インターフェロン- γ (Interferon- γ)、インターフェロン- ω (Interferon- ω)、インターフェロン- τ (Interferon- τ)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、エリスロポエチン (Erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、クローソ (Klotho) 蛋白質、レプチン (Leptin)、繊維芽細胞増殖因子 1~19 (Fibroblast Growth Factor-1~19)、ミッドカイン (Midkine)、カルシトニン (Calcitonin)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、グルカゴン (Glucagon)、インスリン (Insulin)、インスリン様成長因子 1 (Insulin-like Growth Factor-1)、オステオジェニックプロテイン 1 (Osteogenic Protein-1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Growth Factor)、アミリン (Amylin)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、プラスミノーゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon-like Peptide)、成長ホルモン (Growth Hormone)、ナトリウム利尿ペプチド類 (Natriuretic Peptide)、プラスミノーゲン (Plasminogen)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、エンドスタチン (Endostatin)、ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor)、リシン (Ricin)、シュードモナス外毒素 (Pseudomonas Exotoxin)、ジフテリア毒素 (Diphtheria Toxin) およびそれらの溶解性レセプターならびにそれらの誘導体からなる群より選ばれる請求の範囲 23 記載の方法。

26. 生理活性ポリペプチドの誘導体が、該ポリペプチドのアミノ酸欠失体、アミノ酸置換体、アミノ酸挿入体、アミノ酸付加体、糖鎖欠失体および糖鎖付加体からなる群より選ばれる請求の範囲 23 ~ 25 のいずれか1項に記載の方法。

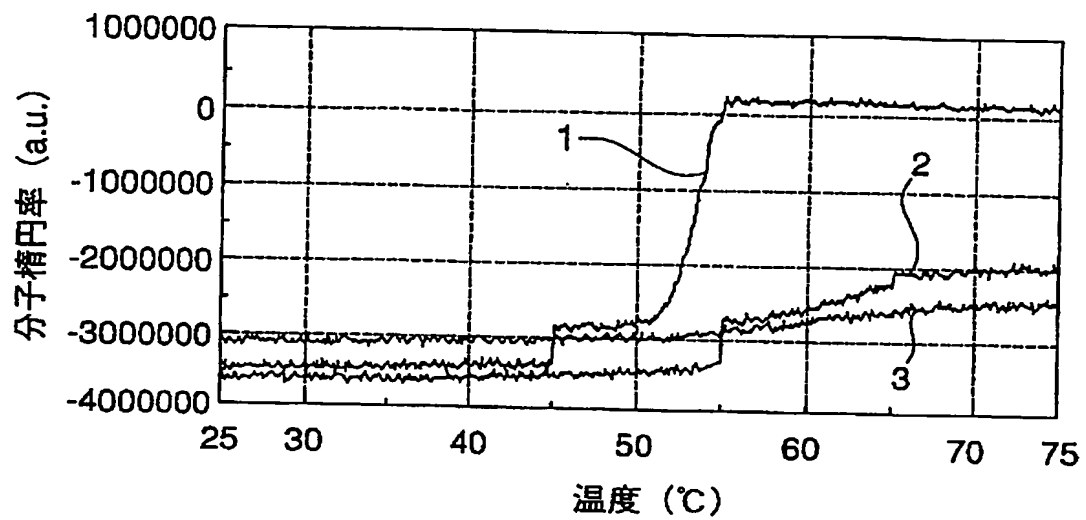
27. 低分子化合物が少なくとも 1 個の請求の範囲 1 ～ 12 および 14 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物で直接またはスペーサーを介して修飾された化学修飾低分子化合物。

28. 請求の範囲 27 記載の化学修飾低分子化合物を含有する医薬。

29. 請求の範囲 1 ～ 12 および 14 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物で低分子化合物を化学修飾することを特徴とする、該低分子化合物の安定性または水溶性を向上させる方法。

30. 請求の範囲 1 ～ 12 および 14 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物を含有することを特徴とする生理活性ポリペプチドもしくはその誘導体または低分子化合物の化学修飾剤。

第1図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<110> TECNO NETWORK SHIKOKU CO., LTD.

<120> Glycerol derivatives

<130> P04578400

<150> JP 2002-281364

<151> 2002-09-26

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide substituted on 5 amino acids of hG-CSF

<400> 1

Met	Ala	Pro	Thr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu
-1	1				5					10					15
Lys	Ser	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu
				20					25						30
Gln	Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu
			35					40					45		
Val	Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser
		50					55					60			
Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His
65					70					75					80
Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile
				85					90					95	
Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala
			100					105					110		
Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala
		115					120					125			

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
 130 135 140
 Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170 175

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide substituted on 5 amino acids of hG-CSF

<400> 2

Ala Pro Thr Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30
 Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
 35 40 45
 Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60
 Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
 65 70 75 80
 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
 85 90 95
 Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
 100 105 110
 Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
 115 120 125
 Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
 130 135 140
 Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
 145 150 155 160
 Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170 174

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C233/47, 323/52, C07D207/404, C07K14/53, C12N9/00,
A61K38/00, 38/27, 38/28, 38/43, 38/48, 39/395, 47/48,
A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C233/47, 323/52, C07D207/404, C07K14/53, C12N9/00,
A61K38/00, 38/27, 38/28, 38/43, 38/48, 39/395, 47/48,
A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	MALENFANT, Patrick R.L. et al., Dendrimers as Solubilizing Groups for Conducting Polymers: Preparation and Characterization of Polythiophene Functionalized Exclusively with Aliphatic Ether Convergent Dendrons, Macromolecules, 2000, Vol.33, No.10, pages 3634 to 3640	1, 3-7, 27, 30 2, 8-26, 28-29
X A	MALENFANT, Patrick R.L. et al., Dendrimer-Supported Oligothiophene Synthesis: Aliphatic Ether Dendrimers in the Preparation of Oligothiophenes with Minimal Substitution, Chemistry of Materials, 1999, Vol.11, No.12, pages 3420 to 3422	1, 3-7, 27, 30 2, 8-26, 28-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
14 October, 2003 (14.10.03)

Date of mailing of the international search report
04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11214

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	MALENFANT, Patrick R.L. et al., Dendrimer-supported solution synthesis of oligothiophenes without beta substituents, Polymeric Materials Science and Engineering, 1999, No.80, pages 171 to 172	1,3-7,27,30 2,8-26,28-29

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07C233/47, 323/52, C07D207/404, C07K14/53, C12N9/00,
A61K38/00, 38/27, 38/28, 38/43, 38/48, 39/395, 47/48, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07C233/47, 323/52, C07D207/404, C07K14/53, C12N9/00,
A61K38/00, 38/27, 38/28, 38/43, 38/48, 39/395, 47/48, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	MALENFANT, Patrick R. L. et al., Dendrimers as Solubilizing Groups for Conducting Polymers: Preparation and Characterization of Polythiophene Functionalized Exclusively with Aliphatic Ether Convergent Dendrons Macromolecules, 2000, Vol. 33 No. 10, p. 3634-3640	1, 3-7, 27, 30 2, 8-26, 28-29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 10. 03

国際調査報告の発送日

04.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本堂裕司

4H

9049

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	MALENFANT, Patrick R. L. et al., Dendrimer-Supported Oligothiophene Synthesis: Aliphatic Ether Dendrimers in the Preparation of Oligothiophenes with Minimal Substitution Chemistry of Materials, 1999, Vol.11 No.12, p.3420-3422	1, 3-7, 27, 30 2, 8-26, 28-29
X A	MALENFANT, Patrick R. L. et al., Dendrimer-supported solution synthesis of oligothiophenes without beta substituents Polymeric Materials Science and Engineering, 1999, No.80, p.171-172	1, 3-7, 27, 30 2, 8-26, 28-29

特 許 協 力 条 約

PCT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

（法第12条、法施行規則第56条）
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 21 OCT 2004

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 P 0 4 5 7 8 4 0 0	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO3/11214	国際出願日 (日.月.年) 02.09.2003	優先日 (日.月.年) 26.09.2002
国際特許分類 (IPC) Int.Cl. ⁷ C07C233/47, 323/52, C07D207/404, C07K14/53, C12N9/00, A61K38/00, .38/27, 38/28, 38/43, 38/48, 39/395, 47/48, A61P43/00		
出願人 (氏名又は名称) 協和醸酵工業株式会社		

<p>1. この報告書は、PCT35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。 法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。</p> <p>2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。</p> <p>3. この報告には次の附属物件も添付されている。</p> <p>a <input type="checkbox"/> 附属書類は全部で _____ ページである。</p> <p><input type="checkbox"/> 補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面の用紙（PCT規則70.16及び実施細則第607号参照）</p> <p><input type="checkbox"/> 第I欄4.及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙</p> <p>b <input type="checkbox"/> 電子媒体は全部で _____ (電子媒体の種類、数を示す)。 配列表に関する補充欄に示すように、コンピュータ読み取り可能な形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。（実施細則第802号参照）</p>	
<p>4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 第I欄 国際予備審査報告の基礎</p> <p><input type="checkbox"/> 第II欄 優先権</p> <p><input type="checkbox"/> 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成</p> <p><input type="checkbox"/> 第IV欄 発明の単一性の欠如</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 第V欄 PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明</p> <p><input type="checkbox"/> 第VI欄 ある種の引用文献</p> <p><input type="checkbox"/> 第VII欄 国際出願の不備</p> <p><input type="checkbox"/> 第VIII欄 国際出願に対する意見</p>	

国際予備審査の請求書を受理した日 18.03.2004	国際予備審査報告を作成した日 30.09.2004	
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (IPEA/JP)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>本堂裕司</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3443</p>	<p>4 H 9 0 4 9</p>

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (2004年1月)

第I欄 報告の基礎

1. この国際予備審査報告は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎とした。

☐ この報告は、_____ 語による翻訳文を基礎とした。
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。

- ☐ PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査
☐ PCT規則12.4にいう国際公開
☐ PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書

第 _____ ページ、出願時に提出されたもの
 第 _____ ページ*、 _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ ページ*、 _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☐ 請求の範囲

第 _____ 項、出願時に提出されたもの
 第 _____ 項*、PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 第 _____ 項*、 _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ 項*、 _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☐ 図面

第 _____ ページ/図、出願時に提出されたもの
 第 _____ ページ/図*、 _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ ページ/図*、 _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☐ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☐ 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表(具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること) _____

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表(具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に“superseded”と記入されることがある。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	2, 8-26, 28-29	有 無
	請求の範囲	1, 3-7, 27, 30	
進歩性 (IS)	請求の範囲	2, 8-26, 28-29	有 無
	請求の範囲	1, 3-7, 27, 30	
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-30	有 無
	請求の範囲		

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : MALENFANT, Patrick R. L. et al.;
Dendrimers as Solubilizing Groups for Conducting Polymers:
Preparation and Characterization of Polythiophene Functionalized
Exclusively with Aliphatic Ether Convergent Dendrons
Macromolecules, 2000, Vol. 33 No. 10, p. 3634-3640

文献2 : MALENFANT, Patrick R. L. et al.,
Dendrimer-Supported Oligothiophene Synthesis: Aliphatic Ether
Dendrimers in the Preparation of Oligothiophenes with Minimal
Substitution
Chemistry of Materials, 1999, Vol. 11 No. 12, p. 3420-3422

文献3 : MALENFANT, Patrick R. L. et al.,
Dendrimer-supported solution synthesis of oligothiophenes without
beta substituents
Polymeric Materials Science and Engineering, 1999, No. 80, p. 171-172

請求の範囲1, 3-7, 27, 30は、国際調査報告で引用された文献1のScheme 1, 2に記載されているので、新規性及び進歩性を有さない。

請求の範囲1, 3-7, 27, 30は、国際調査報告で引用された文献2のScheme 1, 2に記載されているので、新規性及び進歩性を有さない。

請求の範囲1, 3-7, 27, 30は、国際調査報告で引用された文献3のScheme 1, 2に記載されているので、新規性及び進歩性を有さない。

請求の範囲2, 8-26, 28-29に記載された化合物、その誘導体及び用途は、国際調査報告で引用された文献又は当該発明に関連があると認められるいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当業者にとって自明なものでもない。

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2003/011214



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P04578400	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416	
International application No. PCT/JP2003/011214	International filing date (day/month/year) 02 September 2003 (02.09.2003)	Priority date (day/month/year) 26 September 2002 (26.09.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07C 233/47, 323/52, C07D 207/404, C07K 14/53, C12N 9/00, A61K 38/00, 38/27, 38/28, 38/43, 38/48, 39/395, 47/48, A61P 43/00		
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.		

1.	This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.
3.	This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: <ul style="list-style-type: none"> a. <input type="checkbox"/> (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of _____ sheets, as follows: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). <input type="checkbox"/> sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____, containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).
4.	This report contains indications relating to the following items: <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the report <input type="checkbox"/> Box No. II Priority <input type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability <input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention <input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement <input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited <input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application <input type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 March 2004 (18.03.2004)	Date of completion of this report 30 September 2004 (30.09.2004)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/JP2003/011214

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language _____, which is language of a translation furnished for the purpose of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)

2. With regard to the elements of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

- ☒ The international application as originally filed/furnished

- ☐ the description:

pages _____, as originally filed/furnished

pages* _____ received by this Authority on _____

pages* _____ received by this Authority on _____

- ☐ the claims:

pages _____, as originally filed/furnished

pages* _____, as amended (together with any statement) under Article 19

pages* _____ received by this Authority on _____

pages* _____ received by this Authority on _____

- ☐ the drawings:

pages _____, as originally filed/furnished

pages* _____ received by this Authority on _____

pages* _____ received by this Authority on _____

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) – see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/figs _____

☐ the sequence listing (*specify*): _____

☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/figs _____

☐ the sequence listing (*specify*): _____

☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*): _____

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/JP03/11214

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	2, 8-26, 28-29	YES
	Claims	1, 3-7, 27, 30	NO
Inventive step (IS)	Claims	2, 8-26, 28-29	YES
	Claims	1, 3-7, 27, 30	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-30	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

Document 1: Dendrimers as Solubilizing Groups of Conducting Polymers: Preparation and Characterization of Polythiophene Functionalized Exclusively with Aliphatic Ether Convergent Dendrons, (Patrick R. L. Malenfant, et al.), Macromolecules, Malenfant, 2000, Vol. 33, No. 10, pages 3634-3640

Document 2: Dendrimer-supported Oligothiophene Synthesis: Aliphatic Ether Dendrimers in the Preparation of Oligothiophenes with Minimal Substitution (Patrick R. L. Malenfant, et al.), Chemistry of Materials, 1999, Vol. 11, No. 12, pages 3420-3422

Document 3: Dendrimer-supported Solution Synthesis of Oligothiophenes without Beta Substituents, (Patrick R. L. Malenfant, et al.), Polymeric Materials Science and Engineering, 1999, No. 80, pages 171-172

The subject matters of claims 1, 3-7, 27 and 30 are described in document 1 (Schemes 1 and 2), and so do not appear to be novel or to involve an inventive step.

The subject matters of claims 1, 3-7, 27 and 30 are described in document 2 (Schemes 1 and 2), and so do not appear to be novel or to involve an inventive step.

The subject matters of claims 1, 3-7, 27 and 30 are described in document 3 (Schemes 1 and 2), and so do not appear to be novel or to involve an inventive step.

The compounds and their derivatives, and their uses, described in claims 2, 8-26, 28 and 29, are not described in any of the documents cited in the ISR and the documents that may be relevant to those inventions, nor obvious to a person skilled in the art.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.